



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**FERNANDA MARIANO GARCIA DE SOUZA RODRIGUES**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DO *Zika virus* NO ESTADO DO  
ESPÍRITO SANTO**

**VITÓRIA, ES**

**2018**

**FERNANDA MARIANO GARCIA DE SOUZA RODRIGUES**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DO *Zika virus* NO ESTADO  
DO ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Lúri Drummond Louro

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora Dummer Meira

VITÓRIA, ES

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do  
Espírito Santo, ES, Brasil)  
Bibliotecário: Rafael Lima de Carvalho – CRB-6 MG-002926/O

---

R696d Rodrigues, Fernanda Mariano Garcia de Souza, 1991-  
Diversidade genética do *Zika virus* no estado do Espírito Santo /  
Fernanda Mariano Garcia de Souza Rodrigues – 2018.  
73 f. : il.

Orientador: Iuri Drumond Louro.  
Coorientador: Débora Dummer Meira.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do  
Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Variação Genética. 2. Zika virus. 3. Filogenia. I. Louro, Iuri Drumond.  
II. Meira, Débora Dummer. III. Universidade Federal do Espírito Santo.  
Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

---

**"DIVERSIDADE GENÉTICA DO ZIKA VÍRUS NO ESTADO DO ESPÍRITO  
SANTO"**

Fernanda Mariano Garcia

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da  
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção  
do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado por:

Prof. Dr. Iuri Drumond Louro (UFES)  
Orientador

Profa. Dra. Débora Dummer Meira (UFES)  
Co-orientadora

Profa. Dra. Flavia de Paula (UFES)  
Membro Interno

p/ Prof. Dr. Marcelo dos Santos (UFRN – Participação Remota)  
Membro Externo

Vitória-ES, 06 de março de 2018.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por estar comigo e me dar força para lutar a cada dia.

À minha família que sem ela eu nada seria, meu marido Vinícius pelo amor e compreensão nos períodos mais complicados e difíceis que passei, aos meus pais pelo amor incondicional, por lutarem por mim, orarem e se orgulharem de mim!

Obrigada irmãs, cunhado, sobrinhos, sogros, cada um me ajudou da melhor maneira que pôde e eu sou extremamente grata por isso.

Estou aqui por vocês!

Agradeço ao meu orientador Lúri, por me aceitar no NGHМ desde 2012 e ter me dado a oportunidade de aprender com pessoas incríveis que eu admiro muito, como ele e todos os amigos que fiz.

Em especial agradeço à Michelle Oliveira por ser a idealizadora do projeto, juntamente com meu orientador e o Dr. Luiz Valli (*in memorian*), ao Diego e Lucas, que me ajudarem de perto neste projeto que teve alguns (muitos) percalços e graças a vocês nós conseguimos! Michelle, obrigada ainda por toda ajuda, mesmo distante aprendi muitíssimo com você!! Obrigada pela paciência e pelos puxões de orelha, mesmo sempre na sua calma! rs

Obrigada professora Débora Dummer, por aceitar ser minha co-orientadora e por toda ajuda até fora do projeto! Por suas correções e calma que me passou!

Agradeço à Dra. Flavia de Paula e ao Dr. Marcelo dos Santos por aceitarem ao meu convite de fazer parte da minha banca de avaliação, tenho certeza que aproveitarei muito as sugestões e críticas de vocês.

Ainda agradeço ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da UFES, às agências de apoio e financiamento CAPES pela bolsa de estudos concedida e FAPES por financiar o projeto.

## EPÍGRAFE

*“A persistência é o menor caminho para o êxito”.  
(Charles Chaplin)*

## RESUMO

GARCIA, F.M.S.R. **Diversidade Genética do *Zika virus* no Estado do Espírito Santo**. 2018. 73f. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

O *Zika virus* (ZIKV) é um arbovírus do gênero *Flavivirus* pertencente à família Flaviviridae. Duas principais linhagens são reconhecidas, Asiática e Africana, sendo a linhagem Asiática encontrada no Brasil. Os sintomas da infecção de ZIKV geralmente são brandos, mas existem relatos de casos de óbitos e manifestações neurológicas. Variações genéticas virais estão relacionadas com as diferenças nas manifestações clínicas da doença, portanto pesquisas sobre o genoma, filogenia e distribuição geográfica do vírus podem esclarecer como essas variações afetam a manifestação clínica do ZIKV, além de servir para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos. Apesar da importância, poucos estudos avaliam as variações genéticas virais. Este estudo realizou uma abordagem epidemiológica e filogenética a nível populacional que analisou a diversidade genética do ZIKV no Espírito Santo (ES), e as relações filogenéticas das cepas de ZIKV identificadas com sequências virais disponíveis no GenBank. Constatou-se que os municípios de Vitória, Cariacica e Cachoeiro de Itapemirim foram os mais afetados, sendo a linhagem Asiática a circulante no ES, assim como no restante do país. Foram encontradas 4 variações em 2 genes estudados, no gene E A1023G e C1050T e no gene NS5 C1891T e T1945C. As variações A1023T e C1891T foram descritas pela primeira vez em linhagens Asiáticas neste trabalho, e as variações C1050T e T1945C foram descritas anteriormente em linhagem Asiática apenas uma vez em uma sequência do Rio de Janeiro e três sequências na China, respectivamente. Por fim, apesar das variações genéticas encontradas nas sequências do ES não estarem associadas à mudança de aminoácidos, não se pode descartar que outras mudanças, seja em ligações entre enzimas e o RNA, seja na estrutura das proteínas finais, podem ser causadas por essas variações. Os resultados apresentados podem ser úteis a futuros trabalhos permitindo uma expansão da base de dados apresentando uma visão mais clara da epidemiologia do ZIKV, o que poderá ajudar a determinar a origem geográfica de um novo surto e, além disso, monitorar a eficácia das medidas de controle.

**Palavras-chave:** Diversidade genética, *Zika virus*, Linhagem Asiática, ZIKV no ES.

# GENETIC DIVERSITY OF *Zika virus* IN THE STATE OF ESPÍRITO SANTO

## ABSTRACT

GARCIA, F.M.S.R. **Genetic Diversity of *Zika virus* in the state of Espírito Santo.** 2018. 73f. Dissertation Master in Biotechnology – Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

*Zika virus* (ZIKV) is an arbovirus belonging to the genus *Flavivirus* of the Flaviviridae family. Two main lineages are recognized, Asian and African, the Asian lineage was found in Brazil. The symptoms are usually mild, but there are reports of cases of death and neurological manifestations. Viral genetic variations are related to the differences in the clinical manifestations of the disease, and research on the genome, phylogeny and geographical distribution of the virus can clarify how these variations affect the clinical manifestation of ZIKV and the development of biotechnological products. Despite the importance, few studies evaluate viral genetic variations. This study carried out a population-based epidemiological and phylogenetic approach that analyzed the genetic diversity of ZIKV in Espírito Santo (ES), and the phylogenetic relationships of the ZIKV strains identified with GenBank available viral sequences. It was found that the municipalities of Vitória, Cariacica and Cachoeiro de Itapemirim are the most affected, and the current lineage in ES is the Asian, as well as in the rest of the country. Four variants were found in 2 genes studied, in the E A1023G and C1050T gene and in the NS5 gene C1891T and T1945C. Variations A1023T and C1891T were first described in Asian lines in this work, and the variations C1050T and T1945C were previously described in Asian lineage only once in a sequence from Rio de Janeiro and three sequences in China, respectively. Finally, although the genetic variations found in the ES sequences were not associated with the amino acid change, it can not be ruled out that other changes, either in the links between the enzymes and the RNA, or in the structure of the final proteins, can be caused by these variations. The results presented may be useful for future work, allowing an expansion of the database presenting a clearer view of the epidemiology of ZIKV, which may help to determine the geographical origin of a new outbreak and also monitor the effectiveness of the control.

**Key words:** Genetic diversity, *Zika virus*, Asian lineage, ZIKV in ES.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estados com casos autóctones de febre pelo vírus Zika com confirmação laboratorial .....	14
<b>Figura 2:</b> Linha do tempo de infecções e isolamentos do RNA de <i>Zika virus</i> (1947-2016).....	16
<b>Figura 3:</b> Casos prováveis de dengue, por semana epidemiológica de início de sintomas .....	18
<b>Figura 4:</b> Casos prováveis de febre pelo vírus Zika, por semana epidemiológica de início de sintomas .....	19
<b>Figura 5:</b> Esquema da estrutura viral do <i>Zika virus</i> .....	20
<b>Figura 6:</b> Vírus na forma imatura (esquerda) e na forma madura (direita) .....	20
<b>Figura 7:</b> Esquema da organização genômica do gênero <i>Flavivirus</i> .....	21
<b>Figura 8:</b> Filogenia da família Flaviviridae .....	25
<b>Figura 9:</b> Filogenia do ZIKV diferenciando as linhagens atuais utilizando o método de <i>Neighbor-Joining</i> .....	26
<b>Figura 10:</b> Biossíntese dos flavivirus .....	30
<b>Figura 11:</b> Filogenia do ZIKV a partir dos fragmentos do gene NS5 de amostras do GenBank utilizando o método de <i>neighbor-joining</i> . .....	48
<b>Figura 12:</b> Filogenia do ZIKV a partir dos fragmentos do gene E de amostras do GenBank utilizando o método de <i>neighbor-joining</i> . .....	48
<b>Figura 13:</b> Filogenia do ZIKV a partir dos fragmentos dos genes E e NS5 concatenados de amostras do GenBank utilizando o método de <i>neighbor-joining</i> . ..	49
<b>Figura 14:</b> Gel de agarose mostrando a amplificação do gene E. ....	51
<b>Figura 15:</b> Gel de agarose mostrando a amplificação do gene NS5.....	51
<b>Figura 16:</b> Árvore filogenética incluindo as amostras analisadas neste estudo e sequências de referência do GenBank utilizando o método <i>Neighbor-Joining</i> . .....	53
<b>Figura 17:</b> Árvore filogenética incluindo as amostras analisadas neste estudo e sequências de referência do GenBank utilizando o método <i>Maximum-Likelihood</i> ....	54
<b>Figura 18:</b> Diferença de nucleotídeo no gene E das amostras do ES comparando com amostras de diferentes estados do Brasil. ....	56
<b>Figura 19:</b> Diferença de nucleotídeos no gene E das amostras do ES comparando com amostras de diferentes países.....	57
<b>Figura 20:</b> Diferença de nucleotídeos no gene NS5 das amostras do ES comparando com diferentes estados do Brasil.....	57
<b>Figura 21:</b> Diferença de nucleotídeos no gene NS5 das amostras do ES comparando com diferentes países. ....	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Ano da primeira notificação de ZIKV em diversos países à Organização Mundial da Saúde .....	15
<b>Tabela 2:</b> Número de casos prováveis e incidência de febre pelo vírus Zika, por região e Unidade da Federação .....	17
<b>Tabela 3:</b> Sequência dos <i>primers</i> e sondas utilizadas nos ensaios para a detecção das arboviroses no LACEN .....	39
<b>Tabela 4:</b> Sequência dos <i>primers</i> externos e internos utilizados para a amplificação dos genes NS5 e E .....	41
<b>Tabela 5:</b> Condições padronizadas para os <i>primers</i> FD3-FU1 .....	41
<b>Tabela 6:</b> Condições padronizadas para os <i>primers</i> Unifor-Unirev .....	42
<b>Tabela 7:</b> Condições padronizadas para o <i>primer</i> InterNS5 .....	42
<b>Tabela 8:</b> Condições padronizadas para o <i>primer</i> InterE .....	42
<b>Tabela 9:</b> Tabela de frequência dos casos de ZIKV referenciados ao LACEN-ES...	44
<b>Tabela 10:</b> Distribuição de número de casos confirmados de ZIKV por município do ES.....	45
<b>Tabela 11:</b> Número de acesso no GenBank das amostras utilizadas para filogenia	52
<b>Tabela 12:</b> Distância genética entre grupos do ES x BR x Leste Africana x Oeste Africana x Asiática .....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ZIKV	<i>Zika virus</i>
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
ES	Espírito Santo
OMS	Organização mundial da Saúde
MS	Ministério da Saúde
RNC	região não codificante ( <i>non-coding region</i> )
kDa	Kilo Dalton
Kb	Kilo bases
Pb	pares de bases
PC	Perímetro Cefálico
qRT-PCR	Transcrição reversa quantitativa – Reação em tempo real da polimerase em cadeia ( <i>Quantitative Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction</i> )
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
prM	Precursor de membrana ( <i>Precursor membrane</i> )
RdRp	RNA-dependente de RNA polimerase ( <i>RNA-dependent RNA polymerase</i> )
LACEN-ES	Laboratório Central de Saúde Pública do Espírito Santo
NGHM	Núcleo de Genética Humana e Molecular
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
ML	Máxima verossimilhança ( <i>Maximum Likelihood</i> )

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
1.1 HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA	12
1.2 PROPRIEDADES GERAIS DO ZIKV	19
1.2.1 Estrutura Viral	19
1.2.2 Organização Genômica	21
1.2.2.1 <i>Proteínas Estruturais</i>	22
1.2.2.2 <i>Proteínas não-estruturais</i>	23
1.2.3 Classificação e Filogenia do ZIKV	24
1.3 PATOGENESE DA INFECÇÃO POR ZIKV	27
1.3.1 Transmissão	28
1.3.2 Infecção Viral	29
1.4 QUADRO CLÍNICO E COMPLICAÇÕES	30
1.4.1 Sintomas	30
1.4.1.1 <i>Manifestação Neurológicas</i>	31
1.5 DIAGNÓSTICO	34
1.6 TRATAMENTO E PROFILAXIA	34
1.7 JUSTIFICATIVA	35
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>36</b>
2.1 OBJETIVO GERAL	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	37
3.2 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS CEDIDAS PELO LACEN	38
3.3 DETECÇÃO DO RNA VIRAL NO LACEN-ES	39
3.4 SELEÇÃO DE MARCADORES	39
3.5 AMPLIFICAÇÃO DO <i>Zika virus</i> NO NGHМ	41
3.6 SEQUENCIAMENTO	42
3.7 ANÁLISES FILOGENÉTICAS	43
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
4.1 ANÁLISE DE FREQUÊNCIA	44
4.2 SELEÇÃO DE MARCADORES	47
4.3 AMPLIFICAÇÃO DO RNA DE ZIKV POR PCR	50
4.4 ANÁLISES FILOGENÉTICAS	51
<b>5 CONCLUSÕES</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO 1</b>	

## 1. INTRODUÇÃO

O *Zika virus* (ZIKV) é um arbovírus (*Artrophods-borne virus*) pertencente à família Flaviviridae e foi identificado pela primeira vez em primatas do tipo macaco-rhesus, na floresta Zika em Uganda (Dick *et al.*, 1952).

O principal modo de transmissão do ZIKV é através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o mosquito da espécie *Aedes aegypti* o principal vetor em regiões tropicais. Outros modos de transmissão também são descritos na literatura como: transmissão transplacentária, transplante de órgãos e medula óssea, transfusão sanguínea ou por via sexual (MS, 2015a).

Os sintomas da infecção por ZIKV geralmente são brandos, mas existem relatos de casos de óbitos e manifestações neurológicas, como Síndrome de Guillain-Barré (SGB) e Microcefalia (MS, 2015a).

Os mecanismos virais envolvidos no desenvolvimento dessas malformações, apesar de amplamente estudados, ainda são pouco conhecidos. Sabe-se que as diferenças genéticas virais, assim como a diversidade genética do hospedeiro, podem ajudar explicar a heterogeneidade das manifestações clínicas da doença, sendo necessários mais estudos sobre estas relações.

### 1.1 HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA

Em 1947, por meio de uma rede que monitorava a febre amarela na floresta Zika, em Uganda, o RNA viral do ZIKV foi isolado e identificado pela primeira vez em macacos e, no ano seguinte, isolado de um mosquito *Aedes africanus*, capturado na mesma floresta (Dick *et al.*, 1952).

Os primeiros casos de infecção em humanos foram identificados em Uganda e na República da Tanzânia, em 1952, e, neste mesmo ano, foi confirmada a presença do vírus em humanos na Índia (Smithburn, 1952).

Até o ano de 2007, apenas 16 casos de humanos infectados haviam sido documentados em todo o mundo (Kindhauser *et al.*, 2016), e a primeira vez que o vírus foi identificado fora dos continentes da África e Ásia ocorreu em 2007, na ilha de Yap (Estados Federados da Micronésia – Continente Oceania), sendo também o primeiro grande Surto, com 185 casos de suspeita de ZIKV. A estimativa é que 73% dos residentes de Yap tenham sido infectados pelo ZIKV, porém sem relatos de óbitos, hospitalizações ou nenhum outro tipo de complicação (Lanciotti *et al.*, 2008).

Em 2012 foram publicadas as sequências do genoma viral de cepas de ZIKV coletadas em Camboja, Malásia, Nigéria, Senegal, Tailândia e Uganda e foi feita a inferência das árvores filogenéticas para entender a relação entre elas. A partir deste trabalho, foram identificadas duas cepas distintas do ZIKV: Africana e Asiática (Haddow *et al.*, 2012).

Entre os anos de 2013 e 2014, houve surtos em quatro outros arquipélagos do Pacífico: Polinésia Francesa, Ilha de Páscoa, Ilhas Cook e Nova Caledônia, sendo o principal foco na Polinésia Francesa, apresentando milhares de casos suspeitos (Roth *et al.*, 2014).

Investigações retrospectivas das amostras do surto na Polinésia Francesa reportadas à Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2015 e 2016, indicaram uma possível associação entre infecção por ZIKV e malformações e a danos neurológicos (loos *et al.*, 2014).

Ainda durante o surto na Polinésia Francesa, duas mães e seus bebês recém-nascidos tiveram a confirmação de infecção, e, como não houve a possibilidade de

infecção pelo mosquito nos bebês, concluiu-se que ZIKV pode infectar via transmissão placentária (Besnard *et al.*, 2014).

Em março de 2015, o Brasil notificou à OMS mais de 7 mil casos de uma doença caracterizada por erupções cutâneas do tipo exantema, advindos de estados da região nordeste, entre os meses de fevereiro e abril. Contudo, nenhum diagnóstico de Zika foi realizado, por se tratar de uma doença, até então, inexistente no Brasil (Kindhauser *et al.*, 2016).

Até o final de 2015, 19 estados brasileiros confirmaram laboratorialmente autoctonia da doença do ZIKV e, em outubro deste mesmo ano, o Brasil notificou um aumento recorde nos casos de pacientes que apresentava algum tipo de síndrome neurológica, sendo que de 138 casos, 58 apresentaram um histórico de infecção por ZIKV (Kindhauser *et al.*, 2016) (Figura 1).



**Figura 1:** Estados com casos autóctones de febre pelo vírus Zika com confirmação laboratorial. Fonte: MS, 2016

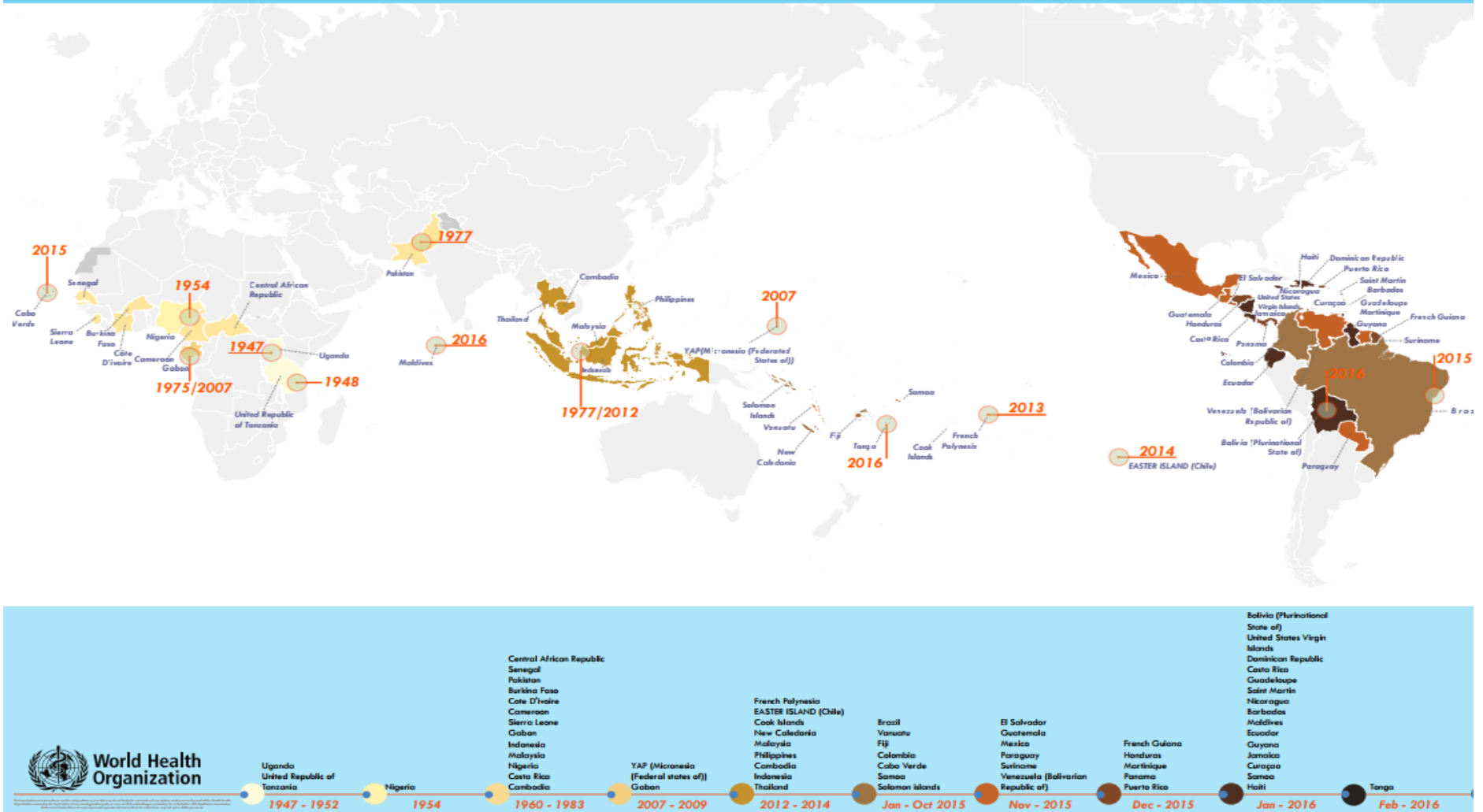
A tabela 1 apresenta a lista dos países com o tipo de entrada do vírus no país, se é autóctone (originária do próprio país), se foi inserido por algum visitante de um país endêmico, ou se foi transmitido por relação sexual, e na figura 2 está representada a linha do tempo (entre 1947 e 2016) com as primeiras notificações da infecção por ZIKV nos diversos países do mundo.

**Tabela 1:** Ano da primeira notificação de ZIKV em diversos países à Organização Mundial da Saúde.

ANO	PAÍS	ENTRADA DO VÍRUS	CONTINENTE
2015	Panamá	Autóctone	América Central
	Honduras	Autóctone	América Central
	Cabo Verde	Autóctone	África
	Venezuela	Autóctone	América do Sul
	México	Autóctone e visitante	América do Norte
	Paraguai	Autóctone	América do Sul
	Guatemala	Autóctone	América Central
	El Salvador	Autóctone	América Central
	Suriname	Autóctone	América do Sul
	Brasil	Autóctone	América do Sul
	Colômbia	Autóctone	América do Sul
2016	Porto Rico	Autóctone	América Central
	Guiana Francesa	Autóctone	América do Sul
	Martinica	Autóctone	América Central
	Bolívia	Autóctone	América do Sul
	República Dominicana	Autóctone	América Central
	São Martinho	Autóctone	América Central
	Guadalupe	Autóctone	América Central
	Haiti	Autóctone	América Central
	Guiana	Autóctone	América do Sul
	Barbados	Autóctone	América Central
	Equador	Autóctone	América do Sul
	Maldivas	Visitante	Ásia
	Estados Unidos da América	Transmissão sexual	América do Norte
	Bonaire	Autóctone	América do Sul
	Aruba	Autóctone	América Central
	Trinidad e Tobago	Autóctone	América do Sul
	Sint Maarten	Autóctone	América Central
	Argentina	Autóctone	América do Sul
	França	Autóctone	Europa
	Dominica	Autóctone	América Central
	Cuba	Autóctone	América Central
	Vietnã	Autóctone	Ásia
	São Vicente e Granadinas	Autóctone	América Central
	Santa Lúcia	Autóctone	América Central
	Peru	Transmissão Sexual	América do Sul
	Chile (Continente)	Transmissão Sexual	América do Sul
	Papua Nova Guiné	Autóctone	Oceania
2017	Índia	Autóctone	Ásia



## Países e territórios mostrando a linha do tempo da propagação do *Zika virus* (1947 – 2016)



**Figura 2:** Linha do tempo de infecções e isolamentos do RNA de *Zika virus* (1947-2016). Mapa-múndi com cores que representam o ano que foi notificado e/ou publicado infecções pelo ZIKV em diversos países do mundo, desde o primeiro isolamento em 1947 em Uganda. Modificado da fonte: kindhauser et al, 2016.

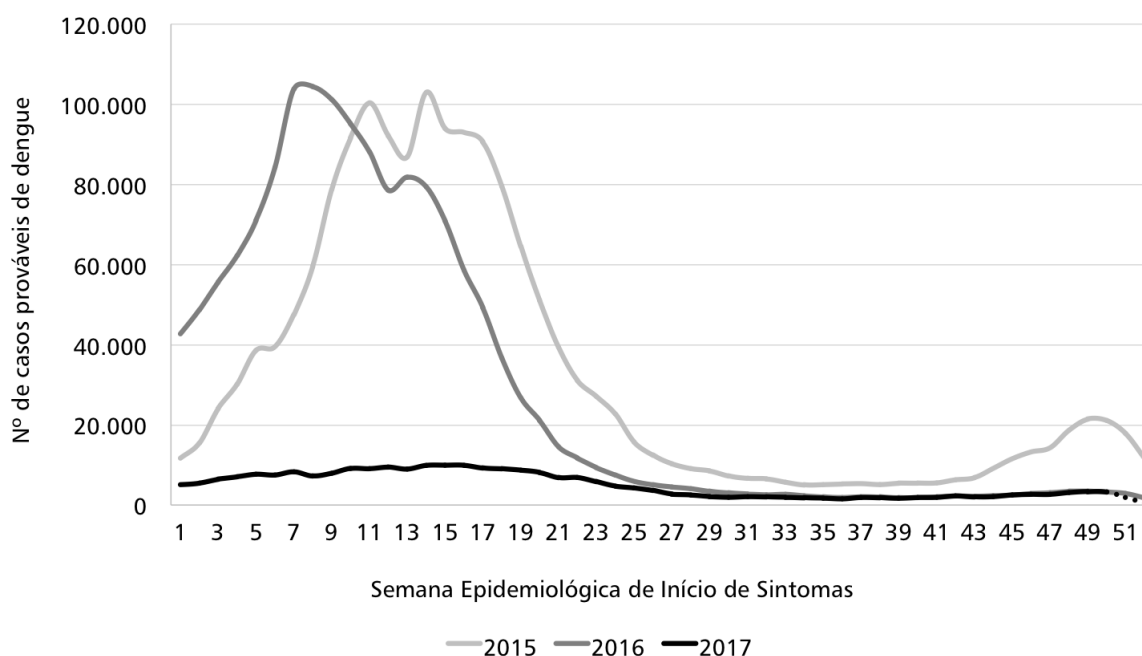
O ano de 2016 foi o mais crítico para o Brasil em relação a febre por ZIKV, quando o país apresentou o maior número de casos prováveis, com 216.207 casos (Tabela 2), incluindo 8 óbitos confirmados laboratorialmente, sendo quatro no estado do Rio de Janeiro, dois no Espírito Santo, um no Maranhão e um em Paraíba.

**Tabela 2:** Número de casos prováveis e incidência de febre pelo vírus Zika, por região e Unidade da Federação. Fonte: MS, 2018.

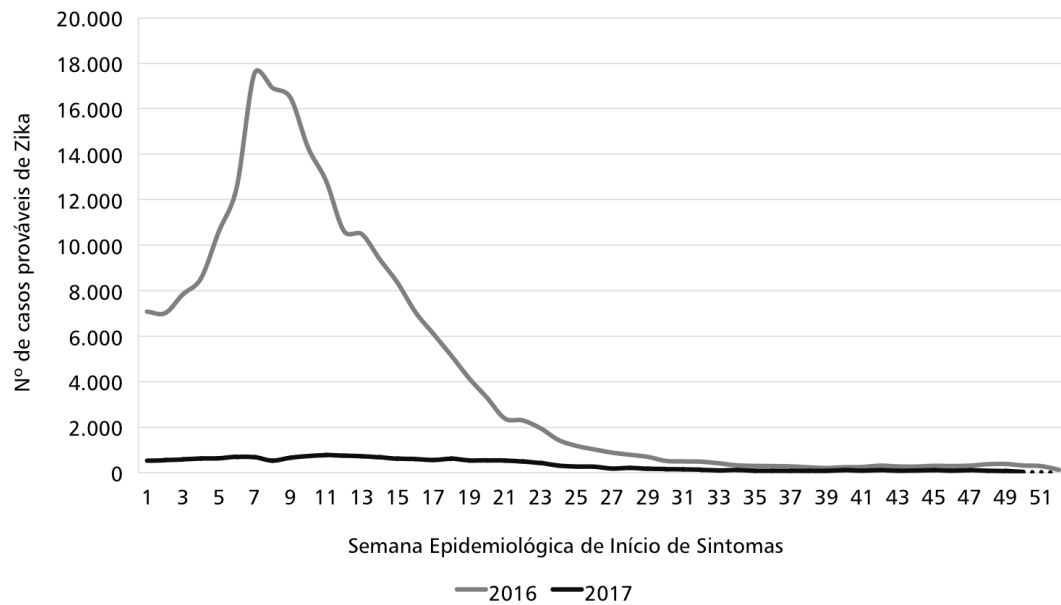
Região/Unidade da Federação	Casos prováveis (n)		Incidência (/100 mil hab.)	
	2016	2017	2016	2017
<b>Norte</b>	<b>12.861</b>	<b>2.201</b>	<b>72,6</b>	<b>12,4</b>
Rondônia	923	141	51,6	7,9
Acre	79	40	9,7	4,9
Amazonas	4.485	429	112,1	10,7
Roraima	169	203	32,9	39,5
Pará	4.664	688	56,4	8,3
Amapá	405	11	51,8	1,4
Tocantins	2.136	689	139,3	44,9
<b>Nordeste</b>	<b>75.338</b>	<b>5.270</b>	<b>132,4</b>	<b>9,3</b>
Maranhão	4.608	516	66,3	7,4
Piauí	236	154	7,3	4,8
Ceará	4.340	1.503	48,4	16,8
Rio Grande do Norte	3.699	460	106,4	13,2
Paraíba	3.750	115	93,8	2,9
Pernambuco	445	39	4,7	0,4
Alagoas	6.827	249	203,2	7,4
Sergipe	217	17	9,6	0,8
Bahia	51.216	2.217	335,3	14,5
<b>Sudeste</b>	<b>92.937</b>	<b>3.732</b>	<b>107,6</b>	<b>4,3</b>
Minas Gerais	13.865	758	66,0	3,6
Espírito Santo	2.333	352	58,7	8,9
Rio de Janeiro	71.529	2.210	430,0	13,3
São Paulo	5.210	412	11,6	0,9
<b>Sul</b>	<b>898</b>	<b>93</b>	<b>3,1</b>	<b>0,3</b>
Paraná	661	61	5,9	0,5
Santa Catarina	69	20	1,0	0,3
Rio Grande do Sul	168	12	1,5	0,1
<b>Centro-Oeste</b>	<b>34.173</b>	<b>6.156</b>	<b>218,2</b>	<b>39,3</b>
Mato Grosso do Sul	1.722	76	64,2	2,8
Mato Grosso	21.628	2.148	654,3	65,0
Goiás	10.477	3.867	156,5	57,8
Distrito Federal	346	65	11,6	2,2
<b>Brasil</b>	<b>216.207</b>	<b>17.452</b>	<b>104,9</b>	<b>8,5</b>

Em 2017, os números diminuíram, registrando 17.452 casos prováveis de febre pelo vírus Zika no país (Tabela 2), destes, 8.839 (50,6%) foram confirmados. As regiões Centro-Oeste e Norte apresentam as maiores taxas de incidência: 39,3 casos/100 mil hab. e 12,4 casos/100 mil hab., respectivamente. Entre os estados, destacaram-se Mato Grosso (65,0 casos/100 mil hab.), Goiás (57,8 casos/100 mil hab.), Tocantins (44,9 casos/100 mil hab.) e Roraima (39,5 casos/100 mil hab.) (Tabela 2). Também foram confirmados laboratorialmente dois óbitos por *Zika virus* nos estados de São Paulo e Rondônia.

Apesar da grande diminuição do número de casos para ZIKV, isto não representa uma erradicação total do vírus no Brasil, a saber, outras arboviroses como a Dengue apresentam um padrão similar. Apesar do vírus sempre circular no país, não ocorre um número elevado de casos todos os anos, como notamos no gráfico da figura 3, que compara o número de casos de dengue nos anos de 2015, 2016 e 2017, e na figura 4 que compara o número de casos de ZIKV nos anos de 2016 e 2017 (MS, 2018).



**Figura 3:** Casos prováveis de dengue, por semana epidemiológica de início de sintomas. Fonte: MS, 2018.

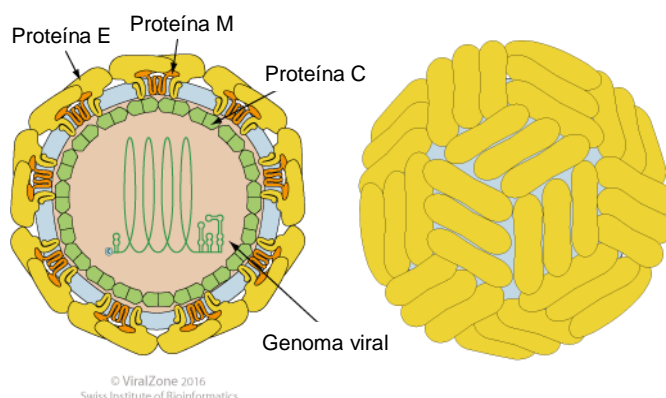


**Figura 4:** Casos prováveis de febre pelo vírus Zika, por semana epidemiológica de início de sintomas. Fonte: MS, 2018.

## 1.2 PROPRIEDADES GERAIS DO ZIKV

### 1.2.1 Estrutura Viral

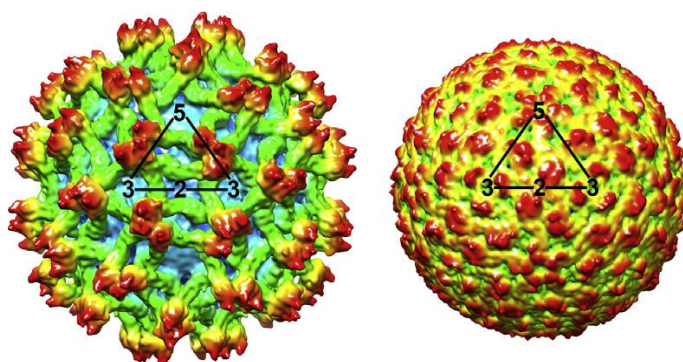
O ZIKV possui um formato esférico com 50nm de diâmetro, um envelope lipoproteico de aproximadamente 30nm que é o nucleocapsídeo, constituído pela proteína C que protege o genoma viral; na superfície possui duas proteínas virais, as glicoproteínas E (envelope) e prM/M (membrana) (King *et al.*, 2012) (Figura 5).



**Figura 5:** Esquema da estrutura viral do *Zika virus*. Modificado da fonte: Viral Zone, 2016.

Cerca de 17% do seu peso é composto por lipídios, que são derivados da membrana celular do hospedeiro, e 9% de carboidratos (glicoproteínas ou glicolipídios), dependendo da composição e estrutura das células hospedeiras (King *et al.*, 2012).

Existem duas formas distintas de vírus, a imatura e a madura (Figura 6). Os vírus na forma madura contêm duas proteínas codificadoras associadas à membrana, E e M. Os vírus imaturos contêm o precursor prM em vez da proteína M, qual é proteoliticamente clivado durante a maturação.



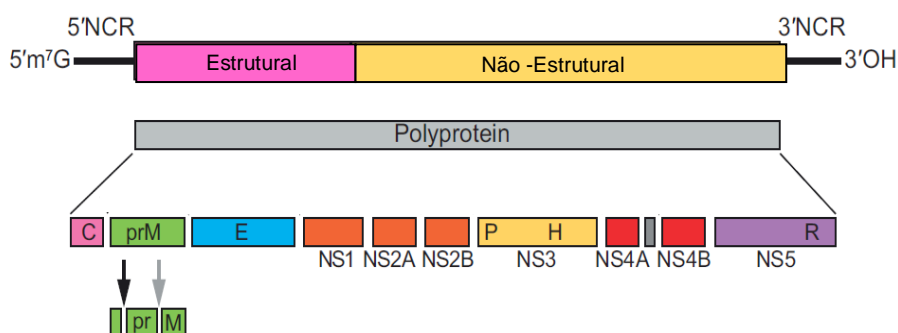
**Figura 6:** Vírus na forma imatura (esquerda) e na forma madura (direita). Fonte: King *et al.* (2012).

### 1.2.2 Organização Genômica

O material genético do ZIKV é formado por apenas uma fita de RNA senso positivo com 10.794Kb (Pertencente ao grupo IV na classificação de Baltimore), similar ao RNA mensageiro humano e, por isso, facilmente transcrito e traduzido pelos ribossomos em proteínas virais (Baltimore, 1971; King *et al.*, 2012).

Esse único RNA viral codifica todas as proteínas estruturais e não estruturais do vírus e é flanqueado por Regiões Não Codificantes (RNC ou NCR do inglês *non-coding region*) com aproximadamente 100 nucleotídeos na região 5' e 450 nucleotídeos na região 3'.

Na região 5', possui um *cap* tipo I ( $m^7GpppAmp$ ) seguido por uma sequência dinucleotídica AG conservada. Na extremidade 3' não possui a cauda poliA, mas sim uma terminação dinucleotídica conservada de Citosina e Uracila, características que o diferencia de outros gêneros da família (Figura 7) (King *et al.*, 2012).



**Figura 7:** Esquema da organização genômica do gênero *Flavivirus*. Modificado da fonte: King *et al.*, 2012.

As RNCs do vírus podem estar relacionadas com a mudança na síntese do RNA de sentido negativo para a produção de RNA viral da progênie (sentido positivo), além de desempenharem um importante papel no empacotamento dos *virions* nascentes e conter sequências nucleotídicas requeridas para iniciar a tradução (Markoff, 2003)

A RNC 5' não é completamente conservada entre as espécies do gênero, ainda que haja sequências com significativa homologia entre subgrupos distintos (Brinton e Dispoto, 1988).

A RCN 3' exibe uma grande variabilidade de tamanhos no gênero, mas apresenta sequências conservadas entre os Flavivirus do tipo arbovirus (Fauquet *et al.*, 2005). A variedade é determinada por inserção ou deleção de sequências repetidas na porção inicial, o que contrasta com a região altamente conservada da porção final, quando se comparam vírus do mesmo sorocomplexo/grupo (Poidinger *et al.*, 1996).

Entre essas regiões, são reconhecidos 10 genes seguidos no sentido 5'-3': C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5 (Figura 7) (Rice *et al.*, 1985; Chambers *et al.*, 1990; Lindenbach *et al.*, 2007).

#### 1.2.2.1 Proteínas Estruturais

Os vírus do gênero *Flavivirus* contém três proteínas estruturais: Proteína do capsídeo (C) com 11kDa; Proteína do Envelope (E) com 50kDa e Glicoproteína da Membrana (prM e M) com 26kDa (King *et al.*, 2012).

A proteína do capsídeo é altamente básica e responsável pela formação do nucleocapsídeo. É homodimérica, e cada monômero possui quatro  $\alpha$ -hélices (Chang *et al.*, 2016). Essa proteína tem uma carga elevada, sendo essencial para assegurar a montagem dos *vírions* pelo empacotamento do RNA genômico (Ma *et al.*, 2004).

A proteína prM é precursora da proteína M, produzida durante a maturação da partícula viral (Lindenbach *et al.*, 2007), está associada à membrana e sua principal função é prevenir que a proteína E sofra rearranjo por catálise ácida durante o

trânsito através da via secretora. A conversão da partícula viral imatura para o vírus maduro ocorre na via secretora e coincide com a clivagem da prM nos fragmentos pr e M, pela protease furina ou por enzimas relacionadas (Stadler *et al.*, 1997; Bastos, 2004).

A proteína E é a maior proteína de superfície dos Flavivirus, é uma estrutura em forma de espícula que se projeta para fora do envelope viral, e media a ligação com o receptor celular e a fusão intermembrana, e está envolvida com inúmeras atividades biológicas incluindo adsorção do vírus ao receptor celular, fusão da membrana e montagem da partícula viral (Heinz e Allison, 2003; Li *et al.*, 2006; Lupi *et al.*, 2007).

Além disso, a proteína E é dimérica, composta por duas subunidades, cada uma constituída por três domínios: I, II e III. O contato entre os monômeros que formam o dímero não é contínuo ao longo de todo o comprimento da molécula, resultando em um sulco ao longo de todo o comprimento da molécula (Heinz e Allison, 2003).

O domínio I forma uma estrutura barril beta; o II é responsável por se projetar na superfície do vírus e o III é o domínio que mantém uma conformação semelhante à imunoglobulina, envolvendo-se na interação com receptores celulares que contribuem para a entrada do *vírião* na célula hospedeira (Lindenbach *et al.*, 2007).

#### 1.2.2.2 Proteínas não-estruturais

Sete proteínas não-estruturais são sintetizadas pelo vírus: NS1 (46kDa), NS2A (22kDa), NS2B (14kDa), NS3 (70kDa), NS4A (16kDa), NS4B (27kDa) e NS5 (103kDa).



A NS1 é dimérica, N-glicosilada, existente nas formas intra e extracelulares (Jacobs *et al.*, 2000), é altamente conservada e parece ser essencial para a atividade infecciosa dos vírus (Young *et al.*, 2000).

A proteína NS2A é hidrofóbica e possui envolvimento na coordenação da mudança entre o empacotamento e a replicação do RNA (Khromykh *et al.*, 2001).

A NS2B ao se associar com a membrana forma um complexo estável com a NS3, atuando como cofator na atividade proteolítica de clivagem das proteínas não estruturais (Falgout *et al.*, 1991).

Já a proteína NS3 possui diversas funções, como atividade nucleotídeo trifosfatase, RNA helicase e age no processamento de replicação de RNA (Li *et al.*, 1999).

Tanto a proteína NS4A como a NS4B são hidrofóbicas e estão envolvidas no processo de replicação viral e na inibição da sinalização de interferon (Lindenbach *et al.*, 2007).

Por fim, a proteína NS5 é a mais longa e conservada do gênero *Flavivirus*. Possui uma porção C-terminal RNA-dependente de RNA polimerase (RdRp) com atividade de metiltransferase envolvida na modificação da estrutura do *cap* viral (Lindenbach *et al.*, 2007; Faye *et al.*, 2014), considerada uma enzima chave para o processo de replicação viral (Baleotti *et al.*, 2003).

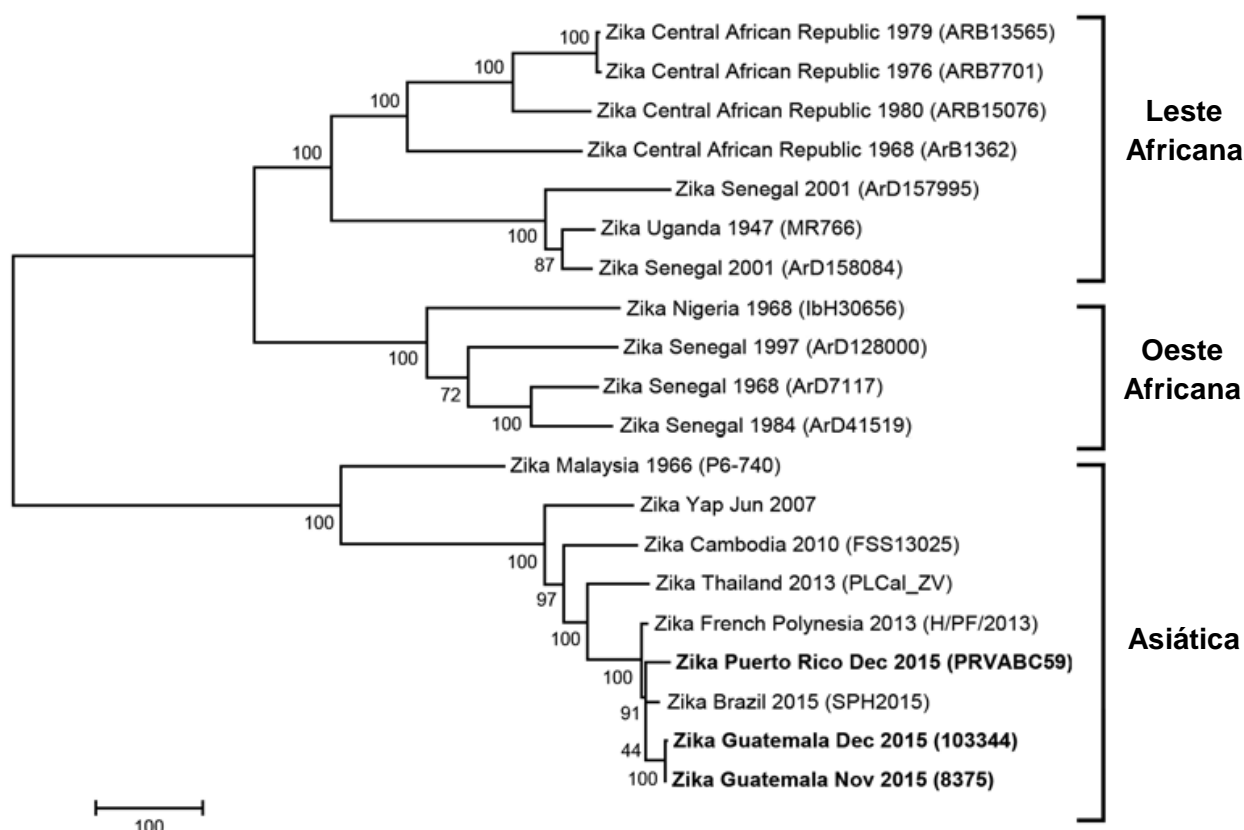
A NS5, especialmente a forma fosforilada, é encontrada no núcleo das células infectadas, podendo estar envolvida na ativação e secreção da interleucina-9, citocina envolvida com o recrutamento de células inflamatórias para o sítio de infecção, o que agrava a infecção viral (Lindenbach *et al.*, 2005).

### 1.2.3 Classificação e Filogenia do ZIKV

**Figura 8:** Filogenia da família Flaviviridae. Modificada da fonte: King et al., 2012.

A comparação de sequências do gene NS5 de 71 flavivirus permitiu avaliar a relação filogenética entre esses vírus com base na divergência genética. (Calisher *et al.*, 1989). As árvores filogenéticas baseadas na sequência de aminoácidos da proteína NS5 apresentaram resultados similares da análise nucleotídica com relação a subdivisões em grupos, clados, e espécies virais (Kuno *et al.*, 1998).

O ZIKV é atualmente classificada em duas cepas no mundo, Africana e Asiática (Figura 9), distinguidas pela sequência genômica de RNA e por regiões homólogas da proteína NS5 (Balm *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2016). A linhagem Africana ainda é dividida em dois grupos: Leste e Oeste Africana, a Leste Africana, contém as variações genéticas do protótipo MR766 isolado em 1947 e a do Oeste surgiu após duas fases de migração do vírus para essa região (Junior *et al.*, 2015; Lanciotti *et al.*, 2016; Saiz *et al.*, 2016).



**Figura 9:** Filogenia do ZIKV diferenciando as linhagens atuais utilizando o método de *Neighbor-Joining*. Modificado da fonte: Lanciotti *et al.*, 2016.

Estudos filogenéticos do genoma viral indicam que a linhagem africana é a responsável pelos surtos que ocorreram na África e que as epidemias registradas na Micronésia, Polinésia Francesa e Brasil foram ocasionados pela linhagem asiática (Baronti *et al.*, 2014).

Um estudo molecular filogenético do genoma viral indicou que o vírus circulante no Brasil tem como ancestral comum mais recente o vírus que circulou na Polinésia Francesa em 2013 (Baronti *et al.*, 2014).

São três as principais teorias sobre como o vírus chegou ao Brasil, sendo que a primeira é que o vírus teria sido introduzido no Brasil durante a copa do Mundo que ocorreu entre junho e julho de 2014 (Zanluca *et al.*, 2015), porém, não se sabe de nenhum país com endemia de ZIKV do Pacífico que tivesse competido no evento.

A segunda teoria é que teria acontecido durante uma competição de canoagem na cidade do Rio de Janeiro, o *Va'a World Sprint*, em agosto de 2014 e cujo campeonato teve competidores de países do Pacífico (Musso, 2015).

E uma terceira teoria é que, provavelmente, chegou ao Brasil na copa das confederações de 2013 (Baronti *et al.*, 2014), no entanto, apesar de ter competidores de países do Pacífico, os casos de ZIKV na Polinésia Francesa só foram reportados após o término deste evento (Faria *et al.*, 2016).

Análises filogenéticas de grande escala podem ser mais informativas sobre a introdução do ZIKV nas diferentes regiões do Brasil do que as atualmente aceitas baseadas em eventos específicos.

### 1.3 PATOGÊNESE DA INFECÇÃO POR ZIKV

### 1.3.1 Transmissão

O ZIKV é transmitido principalmente pela picada do mosquito infectado – geralmente do gênero *Aedes* – táxon distribuído globalmente nativo de regiões tropicais e subtropicais (MS, 2017; Plourde e Bloch, 2016). Na Ásia e nas Américas a principal espécie responsável pelas infecções é o *Aedes aegypti* (Cunha *et al.*, 2016).

Outras formas de transmissão como por via sexual, transfusão sanguínea, infecções congênitas também são relatadas (MS, 2017; WHO, 2016b; Calvet *et al.*, 2016; Calvet *et al.*, 2018).

A transmissão sexual do ZIKV foi descrita entre homem-homem e homem-mulher, o material genético viral foi detectado no sêmen até 62 dias após o início da manifestação febril (Deckard, 2016), a transmissão por via sexual foi fundamentada em casos ocorridos no Colorado, Texas e Taiti (Foy *et al.*, 2011).

Em um estudo em macacos *Rhesus* onde se inoculou o vírus por via subcutânea, foi detectada a presença do ZIKV em fluidos vaginais (Dudley *et al.*, 2016) e também foi encontrado o RNA do ZIKV no muco cervical de uma mulher infectada após três dias de manifestações clínicas da doença (Visseaux *et al.*, 2016), o que demonstra a capacidade de infecção partindo da mulher infectada.

Outra forma de contágio descrita é da mãe para o feto, essa forma foi confirmada pela detecção do vírus no líquido amniótico de duas mulheres que desenvolveram a infecção na gravidez onde os fetos apresentaram microcefalia, e na detecção do ZIKV em recém-nascidos que não tiveram nenhum tipo de contato externo com o vírus, comprovando a capacidade de ultrapassar a barreira placentária, atingir o líquido amniótico e infectar o feto (Calvet *et al.*, 2016).

### 1.3.2 Infecção Viral

O principal alvo para replicação viral são as células mononucleares fagocitárias (Buckley e Gould, 1988).

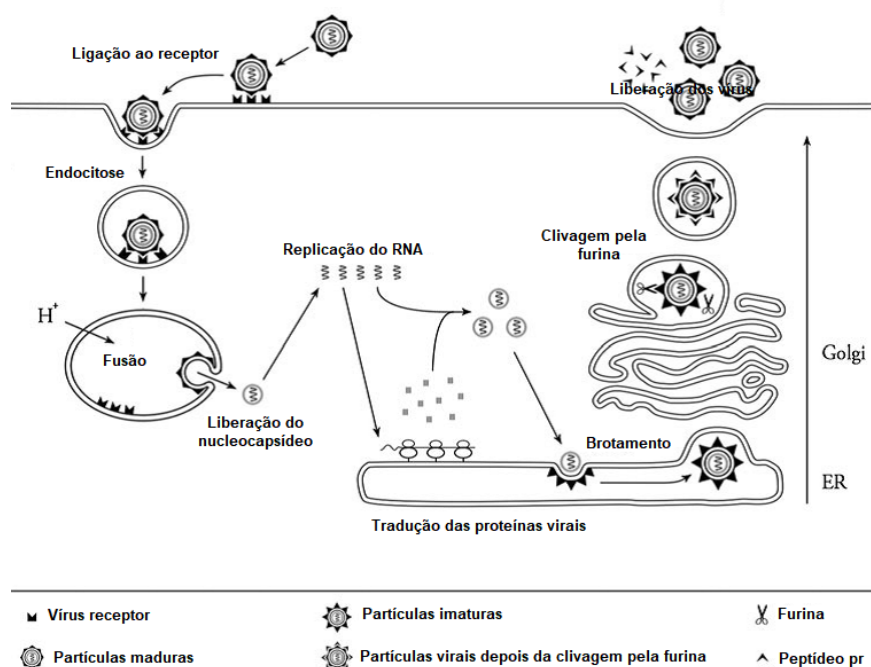
Receptores presentes na superfície das células do hospedeiro, tais como DC-SIGN, AXL, Tyro3 e TIM, mediam a entrada do Vírus na célula humana (Hamel *et al.*, 2015). O vírus Zika se liga a esses receptores penetra por endocitose mediada por clatrina, e em seguida o envelope viral e a membrana do endossoma se fundem, dependendo da variação de pH, que quando em meio ácido, altera a conformação da glicoproteína E, expondo os peptídeos promotores dessa fusão e, consequentemente, libera o nucleocapsídeo viral no citoplasma da célula hospedeira (Chu e Ng, 2004).

Com a quebra do capsídeo viral, começa a transcrição do RNA genômico viral, dando origem a um RNA com polaridade negativa. Esta servirá de molde para a replicação viral, resultando em um único RNA mensageiro dando início a tradução e replicação do RNA mensageiro viral em uma poliproteína que dará origem às proteínas estruturais e não estruturais do vírus (Lindenbach *et al.*, 2007).

A replicação viral ocorre no lúmen do retículo endoplasmático, onde os capsídeos são montados e os *vírions* imaturos são formados por brotamento da membrana da organela na qual estão inseridas as proteínas E e prM que dá origem ao envelope viral (Van Der Schaar *et al.*, 2007).

Posteriormente, os *vírions* são maturados durante o transporte através das vesículas do complexo de golgi, onde a proteína E recebe a glicosilação e a prM é clivada por uma furina, tornando-se M (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010).

Por fim, as partículas virais maduras, são liberadas da célula por exocitose (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010) (Figura 10).



**Figura 10:** Biossíntese dos flavivírus. Modificada da fonte: Rodenhuis-Zybert *et al.* (2010).

## 1.4 QUADRO CLÍNICO E COMPLICAÇÕES

### 1.4.1 Sintomas

O período de incubação do ZIKV não é claro (Who, 2016), mas, geralmente, dura entre 3 e 6 dias, e os sintomas são semelhantes aos de outras infecções por arbovírus, que inclui: febre, exantema pruriginoso, conjuntivite, dores nos músculos e articulações, mal-estar ou dor de cabeça, durando de 2 a 7 dias, podendo apresentar apenas dois ou mais sintomas (Who, 2016). Porém, cerca de 80% dos casos são assintomáticos (Bogoch *et al.*, 2016).

Os pacientes infectados com o ZIKV geralmente não possuem complicações graves, entretanto, há registros de algumas pessoas infectadas que apresentaram manifestações neurológicas, de leve a grave, e em poucos casos evoluíram ao óbito (MS, 2017).

#### *1.4.1.1 Manifestação Neurológicas*

O ZIKV pode levar os infectados à apresentarem manifestações neurológicas, tais como: encefalites, meningoencefalite, mielite, Síndrome de Guillain-Barré (SGB) e Microcefalia (MS, 2015a).

Com a confirmação da circulação do ZIKV no Brasil, em 2015, o Ministério da Saúde (MS) recebeu a notificação do aumento de casos de manifestações neurológicas em pacientes com prévia infecção pelo vírus Zika, destacando-se Síndrome de Guillain-Barré e microcefalia (MS, 2015b).

A SGB é a maior causa de paralisia generalizada no mundo, com incidência anual de 1 a 2 casos por 100.000 habitantes, com maior incidência em homens entre 20 e 40 anos de idade (MS, 2015b; WHO, 2016a).

Nos casos de SGB, o sistema imune humano ataca nervos que controlam o movimento, sensação de dor, temperatura, entre outros, podendo resultar em fraqueza muscular e perda de sensibilidade nos membros inferiores e/ou superiores, sendo esses os primeiros sintomas a aparecerem (Sejvar *et al.*, 2011; WHO, 2016a).

Apesar de uma minoria apresentarem complicações, existem casos graves onde os pacientes evoluem para paralisia das pernas e braços, dos músculos da face e do peito ou, até mesmo, paralisia total. Mesmo nos casos mais graves, os sintomas



desaparecem em algumas semanas sem complicações neurológicas (Sejvar *et al.*, 2011). Contudo, uma minoria, cerca de 3 a 5% dos pacientes, morrem por complicações envolvendo paralisia dos músculos auxiliares da respiração, infecções do sangue, coágulos pulmonares ou parada cardíaca (Hughes *et al.*, 2007).

A causa geralmente é uma infecção viral ou, menos frequente, por complicações cirúrgicas e traumatismos, mas nem sempre é possível determinar as causas da SGB. Seu diagnóstico baseia-se em sintomas, achados dos exames neurológicos e outros testes quando necessário (Yuki e Hartung, 2012).

Não existe cura para a SGB, os tratamentos objetivam a melhora dos sintomas e a abreviação da duração. Os doentes são normalmente hospitalizados para que possam ser monitorados, e tratados na fase aguda da doença com imunoterapia. Caso a fraqueza muscular permaneça após o tratamento, o paciente pode precisar de terapia de reabilitação para reforçar os músculos e recuperar os movimentos (Yuki e Hartung, 2012).

Além da SGB, em outubro de 2015, o Ministério da Saúde do Brasil notificou à OMS sobre um aumento incomum no número de casos de microcefalia entre recém-nascidos no nordeste brasileiro (WHO, 2015).

Até 2014, o ano com mais casos notificados de microcefalia foi em 2012, com 175 casos. Entre 2015 e 2016, foram notificados e confirmados mais de 2000 casos no Brasil (MS, 2017).

Microcefalia é uma malformação congênita, causada quando o encéfalo não se desenvolve adequadamente, comprometendo a normalidade do perímetro cefálico (PC) no recém-nascido (MS, 2015a). Para ser considerado um caso de microcefalia, o PC é definido como menos que dois ou mais desvios-padrão para o mesmo sexo, idade ou tempo de gestação (Alcantara e O'driscoll, 2014).

Esse crescimento insuficiente do cérebro pode causar problemas de desenvolvimento e sua gravidade varia de leve a grave. Seu diagnóstico pode ser feito por ecografia do feto, de preferência entre o final do segundo trimestre e terceiro trimestre. Também é possível após o nascimento, medindo a cabeça do

recém-nascido e comparando com os padrões de crescimento da OMS, considerando a idade gestacional, o peso e o comprimento do bebê (WHO, 2015).

As causas mais comuns de microcefalia são infecções no útero por toxoplasmose, rubéola, herpes, sífilis, citomegalovírus e HIV, exposição a substâncias químicas, anomalias genéticas e má-nutrição grave durante a gravidez (WHO, 2015).

As crianças microcefálicas podem desenvolver epilepsia, paralisia cerebral, dificuldade de aprendizagem, entre outros sintomas durante sua vida. Porém, há relatos de crianças com microcefalia que apresentam desenvolvimento cognitivo normal (WHO, 2015).

A microcefalia congênita com infecção por ZIKV ou “Síndrome congênita pelo vírus Zika”, apresenta particularidades como calcificações intracranianas e outras anormalidades cerebrais, algumas vezes acompanhadas de alterações oculares, escalpo redundante, artrogripose e pé torto (Chan *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2016).

É comum que o crânio de crianças com a síndrome congênita pelo ZIKV apresente uma aparência incomum, caracterizada por um aspecto colapsado da calota craniana, com suturas evertidas e ossos predominantes na região occipital (Mehrijardi *et al.*, 2017).

Tal achado pode ser em parte devido à continuação do crescimento do crânio e da pele, enquanto o tamanho do cérebro regride, ou que, em algum momento, houve o colapso do crânio, que até um momento apresentava dimensões maiores à custa de ventriculomegalia, sendo um achado incomum em casos de microcefalia não associadas à infecção por ZIKV (Werner *et al.*, 2016; Mehrijardi *et al.*, 2017).

Não existe tratamento ou cura para a microcefalia. Uma intervenção precoce com programas de estimulação e lúdicos pode ter um impacto positivo no desenvolvimento, além do aconselhamento às famílias e o apoio aos pais serem de extrema importância (WHO, 2015).

## 1.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de ZIKV é realizado com base nos sintomas e nas informações epidemiológicas, tais como histórico de viagens para áreas com transmissão ativa do vírus, e é confirmado por análises laboratoriais de sangue, soro, urina, saliva, líquido cefalorraquidiano ou sêmen (WHO, 2016b).

Os testes laboratoriais para identificação de ZIKV podem ser realizados por isolamento viral, qRT-PCR (transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase em tempo real) e testes sorológicos de identificação Imunoglobulina M (IgM) ou Imunoglobulina G (IgG). No entanto, alguns testes, como de isolamento viral, são menos utilizados por apresentar algumas desvantagens pela baixa viremia do ZIKV, além de requerer mais tempo para o diagnóstico final (Faye *et al.*, 2013; loos *et al.*, 2014).

Diagnósticos por testes sorológicos, como o ELISA, para detecção de anticorpos específicos IgM ou IgG contra o ZIKV também são realizados. Mas esses métodos possuem limitações que é a possibilidade de haver reação cruzada com outros Flavivirus, resultando em falso-positivos (Hayes, 2009; loos *et al.*, 2014).

Com isso, para a detecção do RNA viral em amostras na fase aguda da doença é utilizada a técnica de qRT-PCR por ser o método mais rápido e sensível, além de quantificar o material genético (loos *et al.*, 2014).

## 1.6 TRATAMENTO E PROFILAXIA

Não existe um tratamento específico para a infecção pelo ZIKV. A recomendação ao paciente é repouso, ingestão de muito líquido e tratar dor e febre com os medicamentos como dipirona ou paracetamol. Para as erupções pruriginosas, os anti-histamínicos podem ser considerados e, caso os sintomas piorem, é aconselhável a consulta com um médico (MS, 2017).

Ainda não existe nenhuma vacina. A prevenção ao ZIKV se dá, principalmente, por meio da eliminação de criadouros de mosquitos e pelo uso individual de repelentes (MS, 2017).

Existem também novas alternativas para o controle vetorial, como armadilhas disseminadoras de larvicidas, estratégias de mapeamento e estratificação de risco, borrifação residual intradomiciliar.

Existem ainda, outras estratégias no âmbito da pesquisa, como a utilização da bactéria *Wolbachia* para supressão da população e bloqueio da transmissão viral, insetos transgênicos e irradiados, serão acompanhadas diretamente pelo MS, buscando a possibilidade de utilização em larga escala (MS, 2017).

## 1.7 JUSTIFICATIVA

Como relatado, o ZIKV possui uma relação com comprometimentos neurais de acometimento brando a grave, e, apesar de confirmada, o mecanismo de como o vírus consegue transpassar a barreira placentária não está claro (Jun *et al.*, 2017; Platt *et al.*, 2018; Soriano-Arandes *et al.*, 2018).

Sabe-se que variações genéticas virais estão relacionadas com as diferenças nas manifestações clínicas da doença (Saiz *et al.*, 2016; Baez *et al.*, 2017).

Para que tais mecanismos sejam esclarecidos, e que futuramente se desenvolva produtos biotecnológicos como vacinas, insumos, e até mesmo alvos terapêuticos, são necessárias pesquisas bases sobre o genoma, filogenia e distribuição geográfica do vírus.

Apesar da urgência no entendimento dos fatores genéticos e epidemiológicos do ZIKV, poucos estudos de distribuição geográfica e diversidade genética do ZIKV foram realizados, sendo que no estado do Espírito Santo (ES) não houve nenhum estudo até a presente data.

Este estudo realizou uma abordagem epidemiológica e filogenética a nível populacional com objetivo de analisar a frequência do ZIKV, e as relações filogenéticas das cepas de ZIKV identificadas com sequências virais disponíveis em bancos de dados.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Analisar a diversidade genética do *Zika virus* no estado do Espírito Santo.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a frequência de infecção por *Zika virus* em amostras referenciadas ao Laboratório Central de Saúde Pública do Espírito Santo (Lacen-ES);
- Inferir a filogenia das cepas virais detectadas nas amostras do ES incluindo na análise sequências retiradas do GenBank;
- Identificar a(s) linhagem(ns) de *Zika virus* circulante(s) no estado do Espírito Santo;
- Comparar as sequências de DNA viral das cepas encontradas no ES em relação ao restante do país.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo faz parte de um projeto maior intitulado “Estudo da diversidade genética e do efeito do *Zika virus* no desenvolvimento de transtornos neurológicos”, o qual possui aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), sob o parecer número 1.819.673 (ANEXO 1).

A solicitação de dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi admitida pelo CEP para o desenvolvimento do presente estudo baseada na Resolução CNS 466/2012-IV que reconhece situações especiais em que há impossibilidade de registro do TCLE.

As amostras utilizadas neste trabalho foram cedidas pelo Lacen-ES, com anuência de colaboração da Dra. Anézia Lima Chaves Ribeiro, Coordenadora Geral do Lacen-ES, e encontram-se atualmente armazenadas no Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM), da UFES sob responsabilidade do Dr. Iúri Drumond Louro.

### 3.2 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS CEDIDAS PELO LACEN

As amostras de sangue utilizadas neste projeto foram coletadas de pacientes atendidos pelo Sistema Único de Saúde no estado do Espírito Santo entre os anos de 2015 e 2017, obedecendo os seguintes critérios de inclusão: casos comuns de municípios sem confirmação laboratorial de autoctonia do vírus, gestantes, recém-nascidos com suspeita de Zika congênita e demais pacientes com síndromes neurológicas associadas à ZIKV, totalizando 1573 casos a serem investigados.

Os casos que não seguiam os critérios de inclusão foram excluídos.

Todas as amostras foram coletadas dentro da janela de detecção do ZIKV de 5 dias para sangue periférico e 14 dias para urina.

### 3.3 DETECÇÃO DO RNA VIRAL NO LACEN-ES

As amostras coletadas foram submetidas ao isolamento de RNA total utilizando o conjunto de reagentes PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit® (ThermoFisher), conforme as especificações do fabricante.

Análises de qRT-PCR foram realizadas para detecção do ZIKV utilizando o conjunto de reagentes SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR Kit® (ThermoFisher) e os *primers* e sondas selecionados para a triagem viral pelo Lacen-ES (Tabela 3).

**Tabela 3:** Sequência dos *primers* e sondas utilizadas nos ensaios para a detecção das arboviroses no Lacen-ES.

<b>Primers ou sonda*</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>	<b>Referência</b>
1087 F	CCGCTGCCCAACACAAG	Lanciotti <i>et al</i> , 2008
1163 R	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	Lanciotti <i>et al</i> , 2008
1108FAM*	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA	Lanciotti <i>et al</i> , 2008

As reações foram realizadas no sistema 7500 Real-Time PCR (Life Technologies) e o algoritmo utilizado na interpretação dos resultados foi: positivo para valor de *Cycle Threshold* (Ct) < 38; inconclusivo para valores de Ct > 38 e <40 e negativo para valor de Ct > 40.

Para o presente estudo foram incluídas somente as amostras diagnosticadas como positivas para ZIKV pelo Lacen-ES. As amostras utilizadas foram mantidas à -80°C até o processamento laboratorial no NGHMH.

### 3.4 SELEÇÃO DE MARCADORES



Para a definição dos marcadores e dos fragmentos genômicos do ZIKV a serem estudados, foi realizado um levantamento bibliográfico de análises filogenéticas do ZIKV, no qual constatou-se que as regiões mais utilizadas para o estudo da diversidade genômica viral foram os genes NS5 e E.

A definição das regiões a serem analisadas neste estudo foi realizada utilizando sequências completas do genoma do ZIKV depositadas no GenBank utilizando o programa MEGA 7.0.21. Uma região de aproximadamente 1000 pares de bases (pb), conservada entre as duas linhagens conhecidas para ZIKV, portanto com variações para distinção entre as mesmas foi selecionada.

Com o alinhamento das 70 sequências do genoma completo do ZIKV no programa MEGA foi realizada uma busca das melhores regiões para a ligação dos *primers*.

Os *primers* externos foram confeccionados com base no trabalho de Faye *et al.* (2008), porém neste trabalho as cepas utilizadas eram apenas da linhagem africana, e para aumentar a sensibilidade de detecção de cepas com maior variabilidade, os *primers* para este estudo foram degenerados.

Para comprovar a especificidade *in silico*, os *primers* foram submetidos às análises pelo Primer-BLAST (NCBI) a fim de encontrar fragmentos genômicos complementares e também ao NetPrimer (Premier Biosoft) para estudo das condições específicas de temperatura de anelamento e possibilidade de formação de dímeros. As mesmas análises foram aplicadas à seleção dos iniciadores internos.

Para saber se os fragmentos seriam suficientes para diferenciar as linhagens existentes, foram confeccionadas árvores filogenéticas com as sequências utilizadas, na qual pôde-se observar que os *primers* se anelaram em regiões capazes de diferenciar entre as principais linhagens: Asiática e Africana.

### 3.5 AMPLIFICAÇÃO DO *Zika virus* NO NGHM

As amostras biológicas incluídas neste estudo foram submetidas à reextração do RNA viral utilizando o mesmo protocolo da primeira extração no Lacen-ES com o kit da ThermoFisher PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit®.

A fim de aumentar a sensibilidade de detecção, foi empregada a técnica de Nested-PCR com *primers* internos desenhados para cada gene, cujas sequências estão descritas na tabela 4 (Externos – FD3/FU1 e Unifor/Unirev e Internos – InterNS5 e InterE).

**Tabela 4:** Sequência dos *primers* externos e internos utilizados para a amplificação dos genes NS5 e E.

<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	Amplicon	Região
FD3-F	TACAWCAYRATGGGMAAAAGAGAAAA	1007pb	Gene NS5
FU1-R	AGCATGTCYTCARTRGTCATCCA		
Unifor-F	TGGGGAAAYGGDTGYGGACTYTTTGG	1079pb	Gene E
Unirev-R	CCYCCRACTGATCCRAAGTCCCA		
InterNS5-F	TACACATACCAAAACAAAGTGGTRAAGG	681pb	Gene NS5
InterNS5-R	TGACCAGGTRGTTCTCCCAGTTGG		
InterE-F	GAAGTCCACAYTGGAACAACAAAGA	603pb	Gene E
InterE-R	TCCRAAGTCCCAGGCTGTRTC		

A síntese de cDNA e o produto da amplificação foram gerados em um único passo através de reações *one step* de transcrição reversa com o kit GoTaq 1-step RT-qPCR® da empresa Promega a partir de um volume de 8 µl de RNA isolado misturado a 10 µl de GoTaq PCR Master Mix, 0,4 µl de GoScript RT Mix, 0,4 µl de cada *primer* e água para completar o volume de 20 µl. Foi realizada a RT-PCR no termociclador Veriti Thermal Cycler® da Applied Biosystems com as condições físicas descritas na tabela 5 para o gene NS5 e na tabela 6 para o gene E.

**Tabela 5:** Condições padronizadas para os *primers* FD3-FU1

<i>RT-PCR</i>	<i>Desnaturação Inicial</i>	<i>Desnaturação</i>	<i>Anelamento</i>	<i>Extensão</i>	<i>Extensão Final</i>	<i>Nº de ciclos</i>
45°C; 15 min	95°C; 2 min	95°C; 15s	68°C; 20s	60°C; 1min	60°C; 5min	40

**Tabela 6:** Condições padronizadas para os *primers* Unifor-Unirev

<b>RT-PCR</b>	<b>Desnaturação Inicial</b>	<b>Desnaturação</b>	<b>Anelamento</b>	<b>Extensão</b>	<b>Extensão Final</b>	<b>Nº de ciclos</b>
45°C; 15 min	95°C; 2 min	95°C; 15 s	75°C; 20 s	60°C; 1min	60°C; 5 min	40

As condições da Nested-PCR utilizadas para o gene NS5 foi utilizado o par de *primers* InterNS5 (F e R) e para o gene E utilizamos o par InterE (F e R). Foi utilizado um volume de 5 µl de produto da primeira PCR, 2,5 µl Buffer 10x, 0,75 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,5 µl dNTP (10mM), 0,5 µl (50mM) de cada *primer*, 0,1 µl de Taq Platinum e água para completar o volume final de 20 µl. Os perfis de termociclagem estão descritas na tabela 7 (InterNS5) e tabela 8 (InterE).

**Tabela 7:** Condições padronizadas para o *primer* InterNS5.

<b>Desnaturação Inicial</b>	<b>Desnaturação</b>	<b>Anelamento</b>	<b>Extensão</b>	<b>Extensão Final</b>	<b>Nº de ciclos</b>
94°C; 2 min	94°C; 30s	63°C; 30s	72°C; 1min	72°C; 5min	35

**Tabela 8:** Condições padronizadas para o *primer* InterE.

<b>Desnaturação Inicial</b>	<b>Desnaturação</b>	<b>Anelamento</b>	<b>Extensão</b>	<b>Extensão Final</b>	<b>Nº de ciclos</b>
94°C; 2 min	94°C; 30s	64°C; 30s	72°C; 1min	72°C; 5min	40

Após a realização das reações de PCR e Nested-PCR em todas as 178 amostras com os *primers* escolhidos, os produtos da Nested-PCR foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose 2%, por 40 minutos a 150 volts e corados com brometo de etídeo para a visualização dos fragmentos.

### 3.6 SEQUENCIAMENTO

Os produtos amplificados foram purificados utilizando a enzima ExoProStar 1-Step® (*GE Healthcare Life Sciences*), da qual 3,2 µl foram adicionados em 8 µl de produto da PCR. Após incubação por 15 minutos a 37°C seguida de 15 minutos a 80°C, os produtos foram armazenados em temperatura -20°C para posterior sequenciamento.

Todas as reações de sequenciamento realizadas neste estudo contaram com o apoio da Plataforma de Sequenciamento de DNA/ PDTIS-FIOCRUZ, Subunidade RPT01A, Rio de Janeiro, RJ, tanto para a realização das reações quanto para a obtenção das sequências.

Para o sequenciamento foi utilizado 2,5 µL do *ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*® V3.1 (*Applied Biosystems*), 3,2 pmoles do iniciador, 2 a 4 µL de DNA purificado e água mili-Q q.s.p. 10 µL. Essas reações consistiram de 25 ciclos (desnaturação a 96°C por 10 segundos; anelamento a 50°C por 5 segundos; extensão a 60°C por 4 minutos). Após a reação, as amostras foram armazenadas ao abrigo da luz a -20°C até a etapa da precipitação com isopropanol e posterior ressuspensão do material em formamida *HiDi* (*Applied Biosystem*). As sequências foram obtidas utilizando os sequenciadores *ABI 3730*® (*Applied Biosystem*).

### 3.7 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Análises filogenéticas foram realizadas por meio da edição e alinhamento das sequências obtidas neste trabalho com sequências de referência de ZIKV obtidas do GenBank utilizando o programa MEGA 7.0.21, pelo método de *Neighbor-Joining* e Kimura 2-parâmetros como modelo de substituição nucleotídica (Tamura *et al.*, 2013) e também pelo método de Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood – ML) (Strimmer e Von Haeseler, 1997), cujo critério foi estimado pelo programa

GARLI v2.0 (Zwickl, 2006). No programa MEGA 7.0.21 também foram realizadas análises de distância genética.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ANÁLISE DE FREQUÊNCIA

Para a análise de frequência dos casos de *Zika virus* no estado do Espírito Santo, foram utilizados os dados de todas as amostras referenciadas ao Lacen-ES.

Essas amostras eram 54.5% (858) de mulheres, 13.6% (214) homens e 31.9% (501) de recém-nascidos (tabela 9) totalizando 1573 casos referenciados ao Lacen-ES. Foi realizado o processo de extração de RNA e qRT-PCR em todas as amostras resultando em 178 casos positivos (26 homens, 140 mulheres e 12 recém-nascidos), 39 inconclusivos (9 homens, 24 mulheres e 6 recém-nascidos) e 1356 negativos (179 homens, 694 mulheres e 483 recém-nascidos) (tabela 9).

**Tabela 9:** Tabela de frequência dos casos de ZIKV referenciados ao Lacen-ES.

	Casos referenciados ao Lacen		Casos confirmados		Casos inconclusivos		Casos negativos	
Homens	214	13.6%	26	12.2%	9	4.2%	179	83.6%
Mulheres	858	54.5%	140	16.3%	24	2.8%	694	80.9%
Recém-nascidos	501	31.9%	12	2.4%	6	1.2%	483	96.4%
<b>Total</b>	1573		178	11.3%	39	2.5%	1356	86.2%

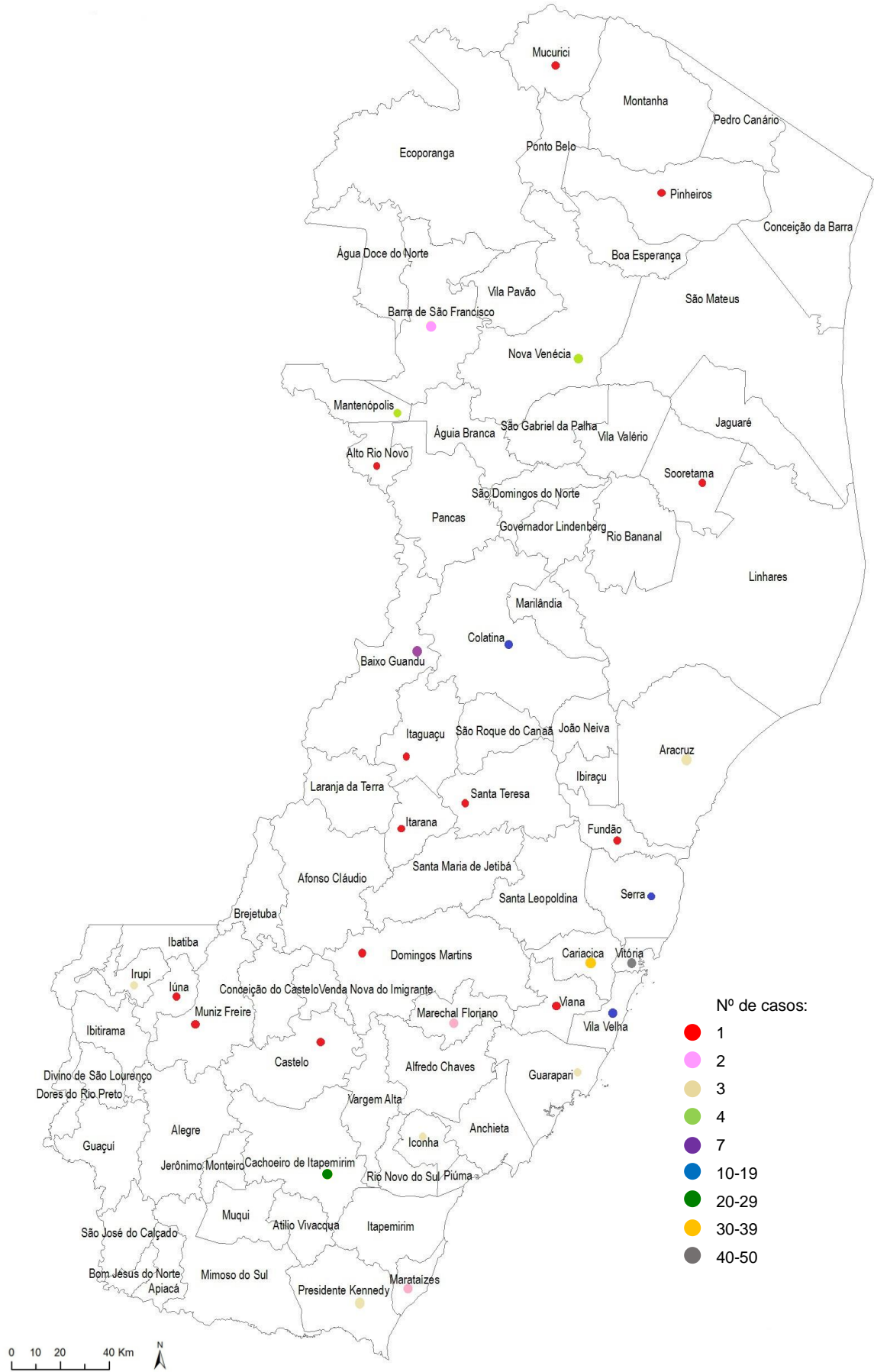
A análise de frequência mostra que 11.3% dos casos foram confirmados positivos, esta é uma relação de todos os casos suspeitos que foram encaminhados ao Lacen-ES e os casos com diagnóstico laboratorial positivo. Para o MS a taxa de casos positivos é de 50,6%, porém a relação apresentada é entre os casos prováveis e confirmados – casos prováveis exclui-se os diagnósticos laboratorial negativo para ZIKV e positivo para outra doença (MS, 2017).

Os casos positivos estão distribuídos em 31 municípios do Espírito Santo com as maiores incidências em Vitória (42), Cariacica (33) e Cachoeiro de Itapemirim (21), seguido por Vila Velha (11), Colatina (11) e Serra (10) (tabela 10).

**Tabela 10:** Distribuição de número de casos confirmados de ZIKV por município do ES.

<b>Município de Residência</b>	<b>Número de casos</b>
Aimorés*	1
Alto Rio Novo	1
Aracruz	3
Baixo Guandu	7
Barra de São Francisco	2
<b>Cachoeiro de Itapemirim</b>	<b>21</b>
<b>Cariacica</b>	<b>33</b>
Castelo	1
Colatina	11
Domingos Mastins	1
Fundão	1
Guarapari	3
Iconha	3
Irupi	3
Itaguaçu	1
Itarana	1
Iuna	1
Mantenópolis	4
Marataízes	2
Marechal Floriano	2
Mucurici	1
Muniz Freire	1
Nova Venécia	4
Pinheiros	1
Presidente Kennedy	3
Santa Tereza	1
Serra	10
Sooretama	1
Viana	1
Vila Velha	11
<b>Vitória</b>	<b>42</b>

\*Aimorés-MG



## 4.2 SELEÇÃO DE MARCADORES

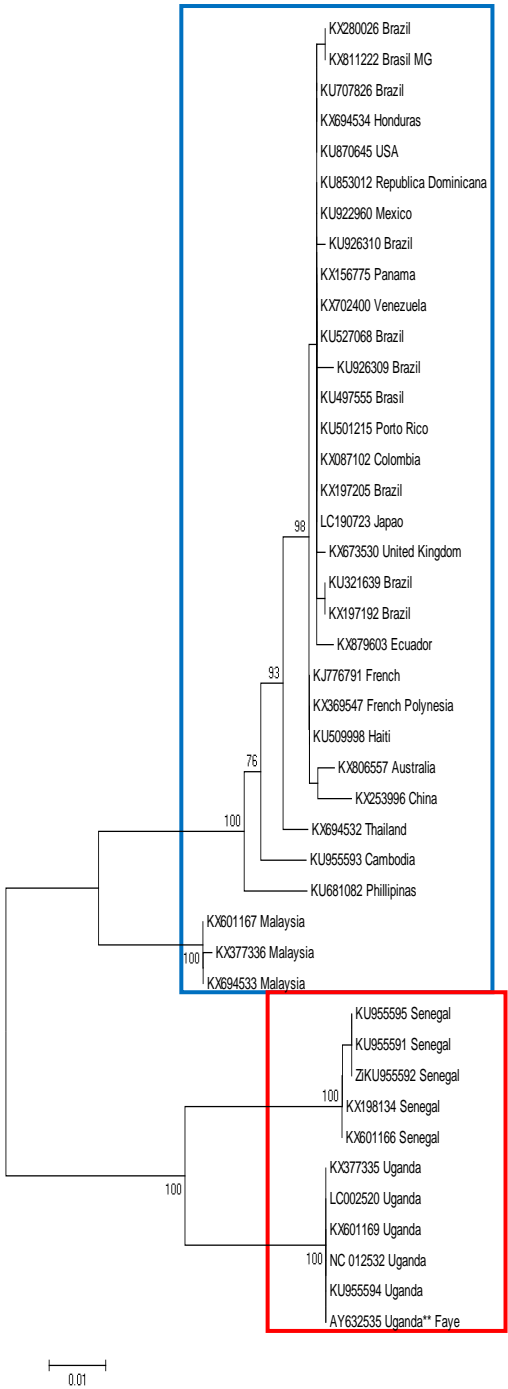
A seleção dos marcadores utilizados neste estudo, baseada em análises filogenéticas de 43 sequências de RNA do GenBank, mostrou a capacidade dos fragmentos gerados na inferência das distintas linhagens reconhecidas para ZIKV, assim como de constituírem uma região contendo uma considerável variabilidade genética.

Essas características podem ser observadas nas topologias obtidas (Figuras 11, 12 e 13), através da presença dos clados isolados de cada linhagem mostrados em azul (linhagem asiática) e vermelho (linhagem africana).

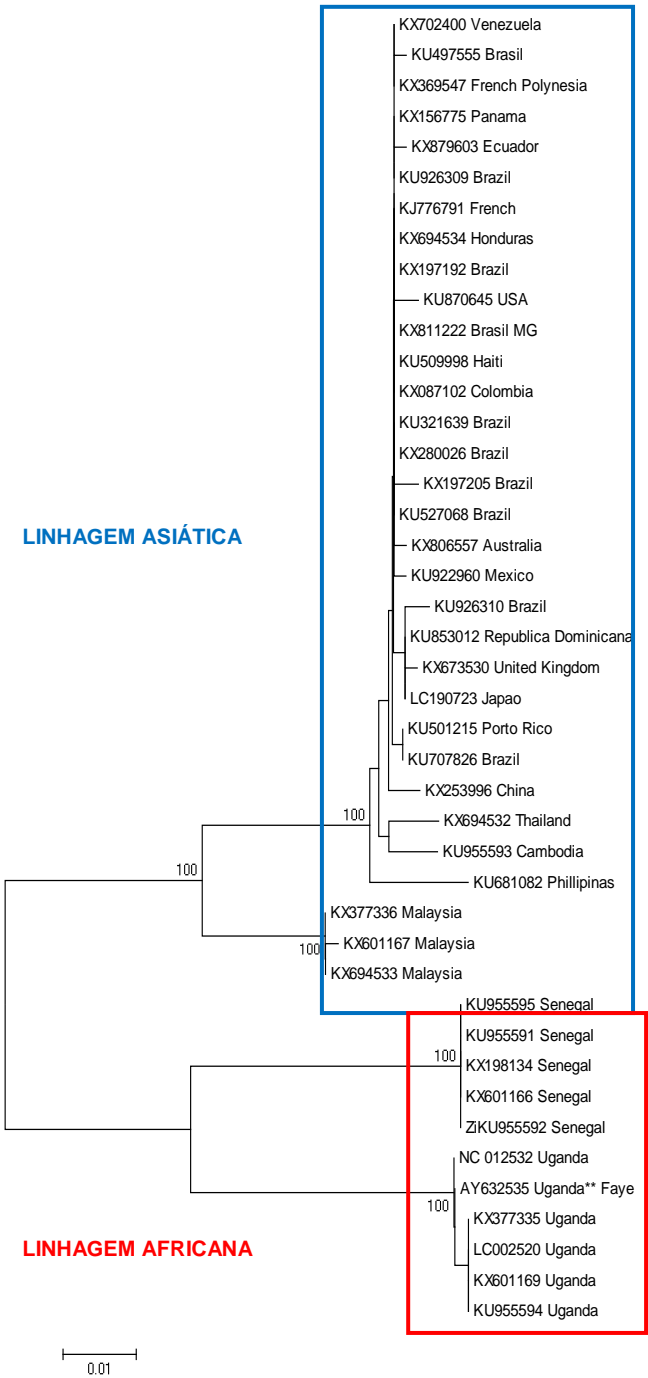
O agrupamento da linhagem asiática mostrou ainda, através de altos valores de *bootstrap* (100%), a existência de dois grupos distintos dentro de cada uma das linhagens estudadas.

Um determinado grau de isolamento geográfico das cepas foi observado através da identificação de cepas da Malásia isoladas das demais cepas da linhagem asiática, assim como das cepas oriundas de Uganda e Senegal em distintos grupos dentro da linhagem africana, mostrando assim, a importância de estudos filogenéticos na caracterização dos vírus circulantes em cada população, especialmente àquelas com associação entre a infecção e manifestações clínicas relevantes, como no Brasil, em relação ao desenvolvimento de transtornos neurológicos.

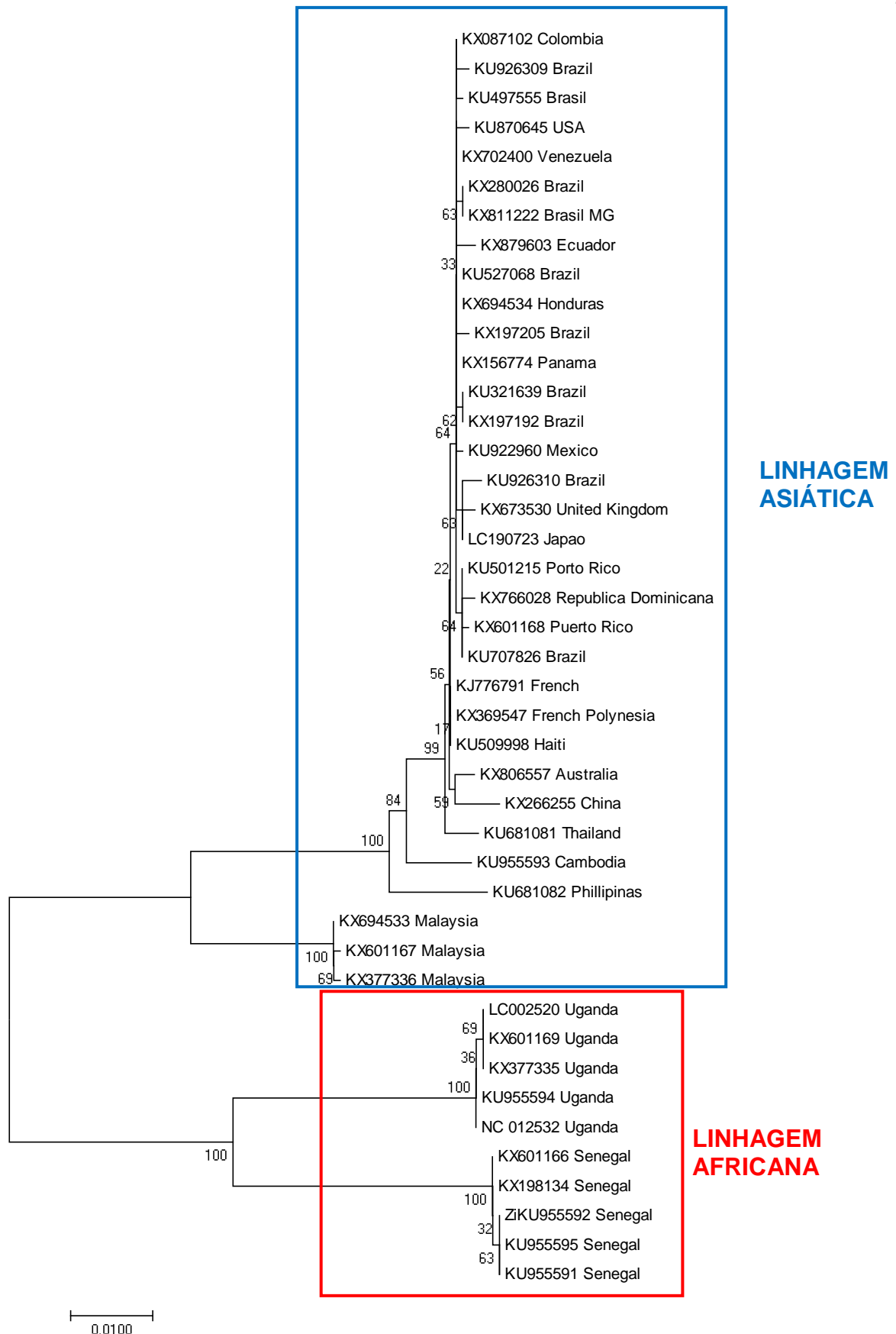




**Figura 11:** Filogenia do ZIKV a partir dos fragmentos do gene NS5 de amostras do GenBank utilizando o método de *neighbor-joining*.



**Figura 12:** Filogenia do ZIKV a partir dos fragmentos do gene E de amostras do GenBank utilizando o método de *neighbor-joining*.



**Figura 13:** Filogenia do ZIKV a partir dos fragmentos dos genes E e NS5 concatenados de amostras do GenBank utilizando o método de *neighbor-joining*.

### 4.3 AMPLIFICAÇÃO DO RNA DE ZIKV POR PCR

Das 178 amostras com resultado positivo para ZIKV diagnosticadas pelo Lacen-ES testadas neste estudo, 7 tiveram o fragmento viral amplificado.

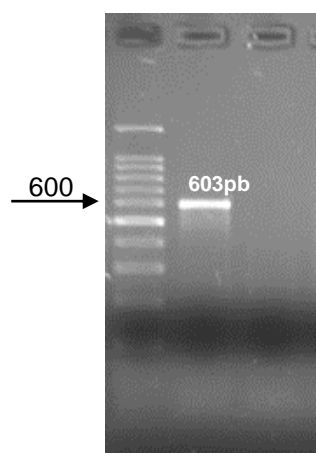
Esse número pode ser explicado devido a alguns fatores como característica da infecção viral, o tempo de coleta, o armazenamento das amostras e o método de diagnóstico. No primeiro momento, quando as amostras foram enviadas ao Lacen-ES, as mesmas estavam recém coletadas e não tinham passado pelo processo de congelamento e descongelamento e o método de análise foi através de qRT-PCR que é uma técnica mais sensível, e pela infecção por ZIKV apresentar uma carga viral baixa, uma técnica sensível e amostras frescas auxiliam na detecção viral.

O início das análises moleculares deste projeto ocorreu em meados de 2016, apesar do correto armazenamento das amostras no Lacen-ES (freezer à -80°C), elas já não eram mais frescas, algumas eram de 2015, e já tinham passado pelo processo de descongelamento para reextração.

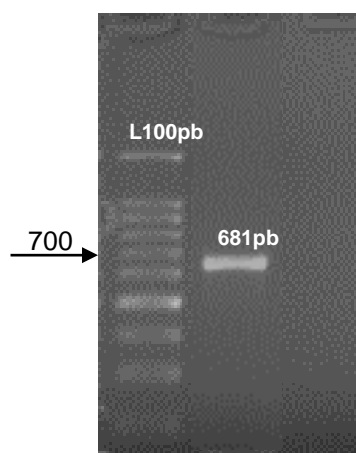
O RNA extraído também foi armazenado à -80°C no NGHМ, havendo um acidente no início do projeto devido uma queda de energia fazendo com que o freezer desligasse e a temperatura das amostras subiu para -60°C. Não tem como determinar a causa da não detecção nessas 172 amostras, mas esses fatores podem ter contribuído.

Outro fator, é que as análises no NGHМ foram feitas em através de PCR convencional que é menos sensível que qPCR (loos *et al.*, 2014).

O resultado obtido das reações de Nested-PCR em cada uma das regiões está apresentado nas figuras 14 e 15.



**Figura 14:** Gel de agarose mostrando a amplificação do gene E.



**Figura 15:** Gel de agarose mostrando a amplificação do gene NS5.

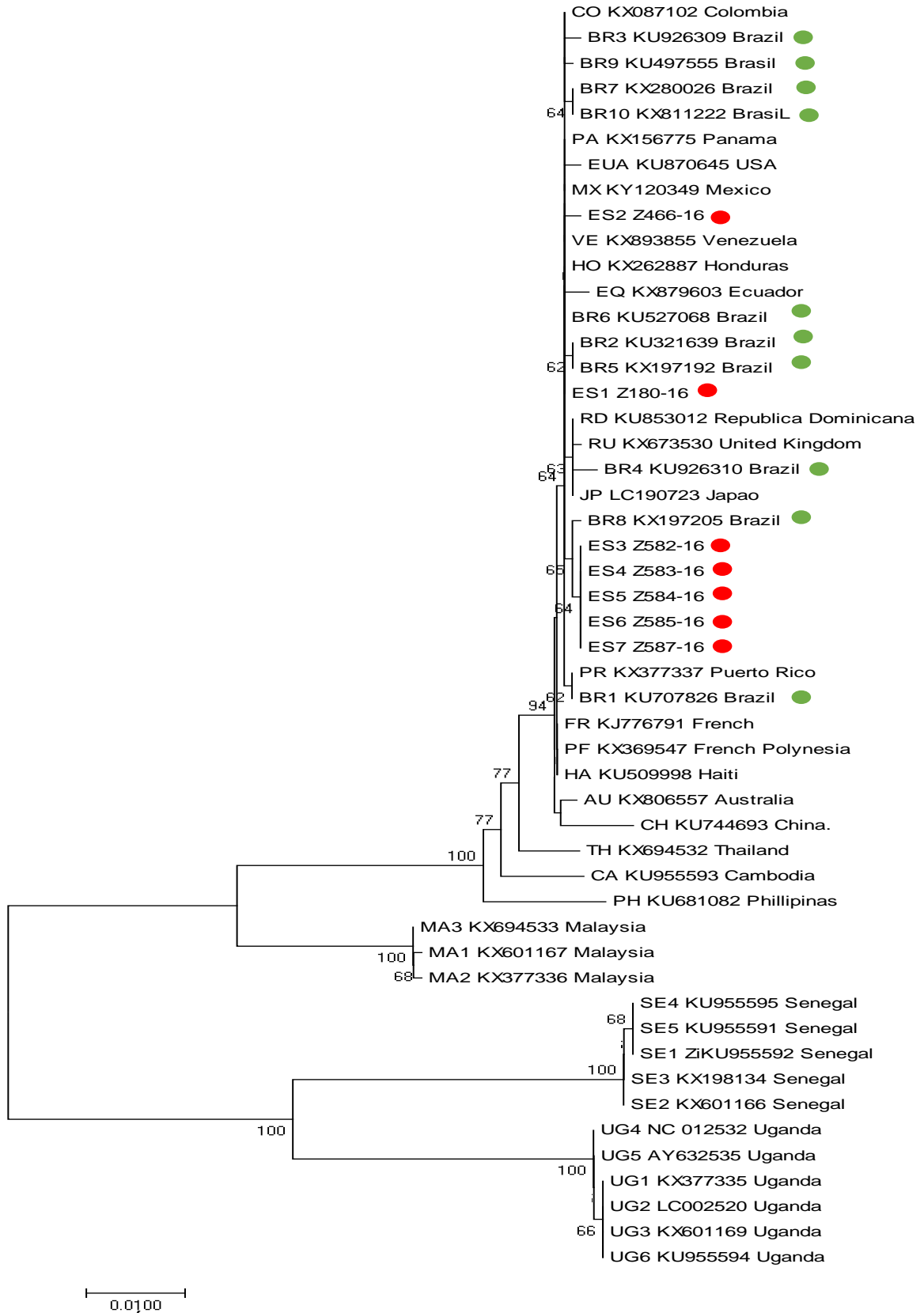
#### 4.4 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

As sete amostras amplificadas para o gene E e o gene NS5 tiveram resultados satisfatórios no sequenciamento de cDNA possivelmente por apresentarem valores de CT mais baixos (entre 12-15), indicando assim, maior carga viral e, conseqüentemente maior possibilidade de reamplificação e sequenciamento.

Na figura 16 está representada a análise filogenética realizada a partir das sequências obtidas neste estudo, sequências de ZIKV de outros estados do Brasil, assim como de outros países disponíveis no *GenBank* (Tabela 11) com o método de *Neighbor-Joining*, assim como na figura 17 com as mesmas sequências utilizando o método de *Maximum Likelihood*.

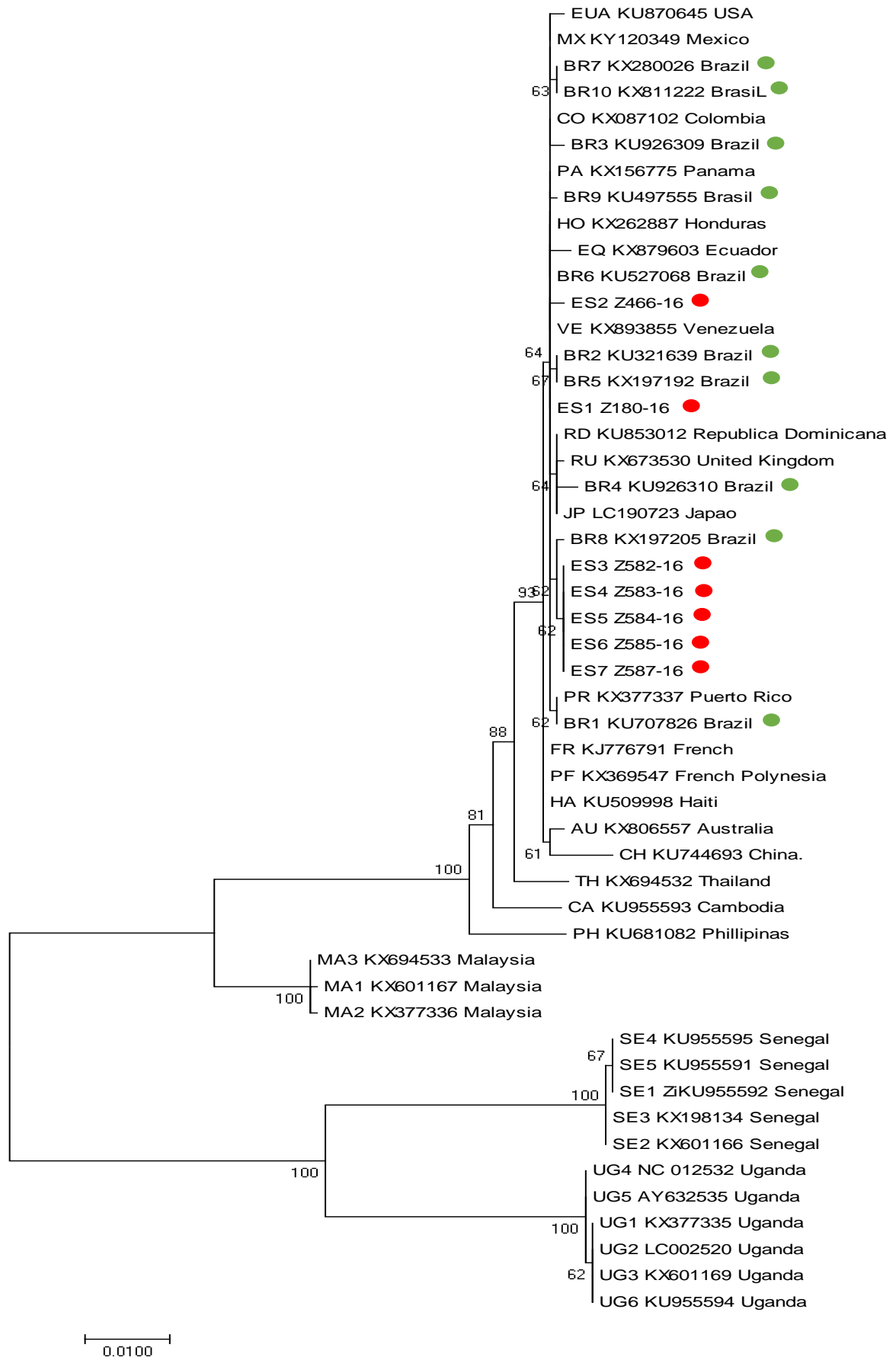
**Tabela 11:** Número de acesso no GenBank das amostras utilizadas para filogenia.

<b>Nº acesso GenBank</b>	<b>País</b>
KX806557	Austrália
KU707826	Brasil – BA
KX811222	Brasil – MG
KU321639	Brasil – CE
KU926309	Brasil – RJ
KU926310	Brasil – RJ
KX197192	Brasil – PE
KU527068	Brasil – RN
KX280026	Brasil – PB
KX197205	Brasil – RJ
KU497555	Brasil – PB
KU955593	Camboja
KU744693	China
KX087102	Colômbia
KX879603	Equador
KU870645	Estados Unidos da América
KJ776791	França
KU509998	Haiti
KX262887	Honduras
LC190723	Japão
KX601167	Malásia
KX377336	Malásia
KX694533	Malásia
KY120349	México
KX156775	Panamá
KX369547	Polinésia Francesa
KU681082	Filipinas
KX377337	Porto Rico
KU853012	República Dominicana
KX673530	Reino Unido
ZiKU955592	Senegal
KX601166	Senegal
KX198134	Senegal
KU955595	Senegal
KU955591	Senegal
KX694532	Tailândia
KX377335	Uganda
LC002520	Uganda
KX601169	Uganda
NC_012532	Uganda
AY632535	Uganda
KU955594	Uganda
KX893855	Venezuela



**Figura 16:** Árvore filogenética incluindo as amostras analisadas neste estudo e sequências de referência do GenBank utilizando o método *Neighbor-Joining*.

Em vermelho estão destacadas as amostras do ES e em verde as amostras do Brasil.



**Figura 17:** Árvore filogenética incluindo as amostras analisadas neste estudo e sequências de referência do GenBank utilizando o método *Maximum-Likelihood*.

As amostras de ZIKV do ES estão agrupadas com a linhagem asiática, assim como as demais sequências de ZIKV disponíveis no banco de dados do GenBank. Cinco sequências do ES foram agrupadas juntas com o *bootstrap* de 62, as outras duas sequências estão agrupadas com outras amostras da cepa asiática com 64 de *bootstrap* na análise de *Maximum Likelihood* (figura 17) e para a análise de *Neighbor-Joining* as sequências obtiveram o mesmo agrupamento, porém com o *bootstrap* de 64 para o grupo das cinco amostras do ES e *bootstrap* de 30 para as demais (figura 16).

Ambos os métodos apresentam as sete amostras do ES incluídas na linhagem asiática, dentre as quais, cinco são mais próximas entre si.

Li *et al.* (2017) analisaram o genoma completo das sequências depositadas no GenBank, tal estudo dividiu as cepas dentro das linhagens Asiática e Africanas (Leste e Oeste Africana), no qual as sequências brasileiras estão incluídas na linhagem Asiática, assim como o trabalho de Yokoyama e Starmer (2017) também com sequências retiradas do GenBank, esses dados são corroborados por este trabalho.

Giovanetti *et al.* (2016) também investigou a diversidade genética de ZIKV, para isso analisaram 63 sequências do gene E, 22 sequências do NS3 e 108 sequências do gene NS5, encontraram como resultado o agrupamento das cepas brasileiras na linhagem Asiática.

Assim como Lanciotti *et al.* (2016), Lessler *et al.* (2016) e Ye *et al.* (2016), também utilizaram as sequências do genoma completo no GenBank e encontraram os mesmos agrupamentos para as cepas brasileiras.

As amostras do ES foram agrupadas para realizar o teste de distância genética entre os outros grupos e os valores encontrados foram de 0,2% e 0,8% comparando com o grupo de amostras brasileiras e as demais da linhagem asiática, respectivamente (Tabela 12).

A maior distância foi encontrada entre o grupo do ES e Leste Africana (11,6%), como esperado, pois as cepas do Leste Africano é o agrupamento da primeira sequência isolada.



**Tabela 12:** Distância genética entre grupos do ES x BR x Leste Africana x Oeste Africana x Asiática.

GRUPOS	Distância
ES X BR	0,2%
ES X Asiática	0,8%
ES X Leste Africana	11,6%
ES X Oeste Africana	10,2%

Haddow *et al* (2012) também analisou a divergência entre as linhagens, a distância entre primeira sequência do Leste Africano e das Ilhas Yap (linhagem asiática) possui a distância semelhante com a encontrada nesse estudo (11,4%) (Tabela 12).

Estes dados demonstram que o vírus circulante no ES possui alta similaridade com as cepas circulantes no restante do país.

De acordo com as análises de sequenciamento para o gene E, cinco das sete amostras do ES apresentam uma mudança em dois nucleotídeos como mostrado na figura 18.

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrv	Group Name
1. Z180-16	
2. Z466-16	
3. Z582-16	
4. Z583-16	
5. Z584-16	
6. Z585-16	
7. Z587-16	
8. KU707826_Brazil	
9. KU321639_Brazil	
10. KU926309_Brazil	
11. KU926310_Brazil	
12. KX197192_Brazil	
13. KU527068_Brazil	
14. KX280026_Brazil	
15. KX197205_Brazil	
16. KU497555_Brazil	
17. KX811222_Brazil	

**Figura 18:** Diferença de nucleotídeo no gene E das amostras do ES comparando com amostras de diferentes estados do Brasil.

A primeira alteração de nucleotídeo é uma mudança de Adenina para Guanina na posição 1023 do gene E, encontrada em cinco das sete sequências do ES, e a segunda é a presença de Citosina no lugar do nucleotídeo Timina na posição 1050 do gene E, encontrada nas mesmas cinco amostras do ES e em uma do Rio de Janeiro depositada no GenBank sob o código KX197205. Essas duas variações estavam descritas até o momento apenas em sequências das linhagens Africanas e a C1050T em apenas uma sequência brasileira (Figura 19).

[illegible]

**Figura 19:** Diferença de nucleotídeos no gene E das amostras do ES comparando com amostras de diferentes países.

Para o gene NS5 em uma amostra foi encontrado diferença em dois nucleotídeos, a primeira de C para T na posição 1891 do gene NS e a segunda de T para C na posição 1945 do gene NS5 (figura 20), sendo a C1891T encontrada apenas nesta amostra do ES, dentre as sequências da linhagem Asiática, e nas cepas do leste africano, a segunda variação também encontrada apenas nessa mesma amostra do ES e nas amostras da China (que pertence também a linhagem asiática) (Figura 21).

DNA Sequences		Translated Protein Sequences	
Species/Abbrev	Group Name		
1. Z180-16		AAGTTC	AGAGATGCAAGACTTGTGGCTGCTGCGGAGGTCAGAGAAAGTGACCAACTTGGT
2. Z466-16		AAGTTC	AGAGATGCAAGACTTGTGGCTGCTGCGGAGGTCAGAGAAAGTGACCAACTTGGT
3. Z582-16		AAGTTC	AGAGATGCAAGACTTGTGGCTGCTGCGGAGGTCAGAGAAAGTGACCAACTTGGT
4. Z583-16		AAGTTC	AGAGATGCAAGACTTGTGGCTGCTGCGGAGGTCAGAGAAAGTGACCAACTTGGT
5. Z584-16		AAGTTC	AGAGATGCAAGACTTGTGGCTGCTGCGGAGGTCAGAGAAAGTGACCAACTTGGT
6. Z585-16		AAGTTC	AGAGATGCAAGACTTGTGGCTGCTGCGGAGGTCAGAGAAAGTGACCAACTTGGT
7. Z587-16		AAGTTC	AGAGATGCAAGACTTGTGGCTGCTGCGGAGGTCAGAGAAAGTGACCAACTTGGT
8. KU070826_Brazil		AAGTTC	AGAGATGCAAGACTTGTGGCTGCTGCGGAGGTCAGAGAAAGTGACCAACTTGGT
9. KU321639_Brazil		AAGTTC	AGAGATGCAAGACTTGTGGCTGCTGCGGAGGTCAGAGAAAGTGACCAACTTGGT
10. KU926309_Brazil		AAGTTC	AGAGATGCAAGACTTGTGGCTGCTGCGGAGGTCAGAGAAAGTGACCAACTTGGT
11. KU926310_Brazil		AAGTTC	AGAGATGCAAGACTTGTGGCTGCTGCGGAGGTCAGAGAAAGTGACCAACTTGGT
12. KX197192_Brazil		AAGTTC	AGAGATGCAAGACTTGTGGCTGCTGCGGAGGTCAGAGAAAGTGACCAACTTGGT
13. KU527068_Brazil		AAGTTC	AGAGATGCAAGACTTGTGGCTGCTGCGGAGGTCAGAGAAAGTGACCAACTTGGT
14. KX280026_Brazil		AAGTTC	GGAGATGCAAGACTTGTGGCTGCTGCGGAGGTCAGAGAAAGTGACCAACTTGGT
15. KX197205_Brazil		AAGTTC	AGAGATGCAAGACTTGTGGCTGCTGCGGAGGTCAGAGAAAGTGACCAACTTGGT
16. KU497555_Brazil		AAGTTC	AGAGATGCAAGACTTGTGGCTGCTGCGGAGGTCAGAGAAAGTGACCAACTTGGT
17. KX811222_Brasil_M		AAGTTC	GGAGATGCAAGACTTGTGGCTGCTGCGGAGGTCAGAGAAAGTGACCAACTTGGT

**Figura 20:** Diferença de nucleotídeos no gene NS5 das amostras do ES comparando com diferentes estados do Brasil

DNA Sequences		Translated Protein Sequences	
Species/Abbrev	Group Name		
1. Z180-16		G T C A G A G A T G C A A G A C T T G T G G C T G C T G C G G A G G T C A G A G A A A G T G A C C A A C T G T G C A	
2. Z466-16		G T T A G A G A T G C A A G A C T T G T G G C T G C T G C G G A G G T C A G A G A A A G T G A C C A A C T G T G C A	
3. Z582-16		G T C A G A G A T G C A A G A C T T G T G G C T G C T G C G G A G G T C A G A G A A A G T G A C C A A C T G T G C A	
4. Z583-16		G T C A G A G A T G C A A G A C T T G T G G C T G C T G C G G A G G T C A G A G A A A G T G A C C A A C T G T G C A	
5. Z584-16		G T C A G A G A T G C A A G A C T T G T G G C T G C T G C G G A G G T C A G A G A A A G T G A C C A A C T G T G C A	
6. Z585-16		G T C A G A G A T G C A A G A C T T G T G G C T G C T G C G G A G G T C A G A G A A A G T G A C C A A C T G T G C A	
7. Z587-16		G T C A G A G A T G C A A G A C T T G T G G C T G C T G C G G A G G T C A G A G A A A G T G A C C A A C T G T G C A	
8. KU707826_Brazil		G T C A G A G A T G C A A G A C T T G T G G C T G C T G C G G A G G T C A G A G A A A G T G A C C A A C T G T G C A	
9. KU321639_Brazil		G T C A G A G A T G C A A G A C T T G T G G C T G C T G C G G A G G T C A G A G A A A G T G A C C A A C T G T G C A	
10. KU926309_Brazil		G T C A G A G A T G C A A G A C T T G T G G C T G C T G C G G A G G T C A G A G A A A G T G A C C A A C T G T G C A	
11. KU926310_Brazil		G T C A G A G A T G C A A G A C T T G T G G C T G C T G C G G A G G T C A G A G A A A G T G A C C A A C T G T G C A	
12. KX197192_Brazil		G T C A G A G A T G C A A G A C T T G T G G C T G C T G C G G A G G T C A G A G A A A G T G A C C A A C T G T G C A	
13. KU527068_Brazil		G T C A G A G A T G C A A G A C T T G T G G C T G C T G C G G A G G T C A G A G A A A G T G A C C A A C T G T G C A	
14. KX280026_Brazil		G T C G G A G A T G C A A G A C T T G T G G C T G C T G C G G A G G T C A G A G A A A G T G A C C A A C T G T G C A	
15. KX197205_Brazil		G T C A G A G A T G C A A G A C T T G T G G C T G C T G C G G A G G T C A G A G A A A G T G A C C A A C T G T G C A	
16. KU497555_Brazil		G T C A G A G A T G C A A G A C T T G T G G C T G C T G C G G A G G T C A G A G A A A G T G A C C A A C T G T G C A	
17. KX811222_Brazil		G T C G G A G A T G C A A G A C T T G T G G C T G C T G C G G A G G T C A G A G A A A G T G A C C A A C T G T G C A	
18. KX253996_China		G T C A G A G A T G C A A G A C T T G T G G C T G C T G C G G A G G T C A G A G A A A G T G A C C A A C T G T G C A	
19. KX266255_China		G T C A G A G A T G C A A G A C T T G T G G C T G C T G C G G A G G T C A G A G A A A G T G A C C A A C T G T G C A	
20. KU820899_China		G T C A G A G A T G C A A G A C T T G T G G C T G C T G C G G A G G T C A G A G A A A G T G A C C A A C T G T G C A	
21. KX117076_China		G T C A G A G A T G C A A G A C T T G T G G C T G C T G C G G A G G T C A G A G A A A G T G A C C A A C T G T G C A	
22. KU744693_China		G T C A G A G A T G C A A G A C T T G T G G C T G C T G C G G A G G T C A G A G A A A G T G A C C A A C T G T G C A	
23. KX377335_Uganda		G T T A G A G A T G C A A G A C T T A T G G T T G T T G A G G A A G C C A G A G A A A G T G A C C A A G A T G T G C A	
24. LC002520_Uganda		G T T A G A G A T G C A A G A C T T A T G G T T G T T G A G G A A G C C A G A G A A A G T G A C C A A G A T G T G C A	
25. KX601169_Uganda		G T T A G A G A T G C A A G A C T T A T G G T T G T T G A G G A A G C C A G A G A A A G T G A C C A A G A T G T G C A	
26. NC_012532_Uganda		G T T A G A G A T G C A A G A C T T A T G G T T G T T G A G G A A G C C A G A G A A A G T G A C C A A G A T G T G C A	
27. KU955594_Uganda		G T T A G A G A T G C A A G A C T T A T G G T T G T T G A G G A A G C C A G A G A A A G T G A C C A A G A T G T G C A	
28. AY632535_Uganda		G T T A G A G A T G C A A G A C T T A T G G T T G T T G A G G A A G C C A G A G A A A G T G A C C A A G A T G T G C A	

**Figura 21:** Diferença de nucleotídeos no gene NS5 das amostras do ES comparando com diferentes países.

Pelas análises realizadas no programa MEGA 7.0.21, as variações nucleotídicas encontradas nas sequências do ES, não estão associadas à mudança de aminoácidos, mas pela falta de outros tipos de análises da proteína não se pode descartar que outras mudanças, seja em ligações entre enzimas e o RNA, seja na estrutura das proteínas finais, podem ser causadas por essas variações.

Yokoyama e Starmer (2017) verificaram que sete das mutações encontradas estão mantidas na linhagem Asiática, e que podem estar associadas aos problemas clínicos enfrentados hoje, apesar de ainda não ter estudos sobre as mesmas.

No estudo de Baez *et al.* (2017) foram encontradas várias mutações em diferentes regiões da proteína E. Três variações estão em regiões que parecem não ter nenhum impacto na estrutura proteica, e outra mutação foi encontrada no resíduo de histidina conservado, sendo a histidina crucial para a iniciação de fusão do vírus, e, portanto, essa variação poderá ter algum impacto na transmissão viral. Também foram encontradas seis mutações exclusivas de pacientes de microcefalia, no entanto, a maioria envolve substituições entre aminoácidos com características muito semelhantes e, portanto, não se deve esperar impacto na estrutura e/ou função dos mesmos segundo Baez *et al.* (2017).

Ainda no estudo de Baez *et al.* (2017) foram encontradas mutações em uma posição que é fortemente conservado entre os flavivírus. Curiosamente, existem duas mutações nessa posição: E311D e E311V, ambos de pacientes americanos e, o segundo, pertencente a um caso de microcefalia. Mutações nessa região podem, portanto, modificar o acesso ao sítio ativo da proteína. Em resumo, as mutações encontradas na proteína NS5 podem estar relacionadas às modificações e interações entre o MTase e o domínios RdRp, regulando o acesso ao sitio ativo e à função da proteína.

Portanto, ainda são de extrema importância que mais estudos de caracterização viral como este sejam feitos, principalmente com grandes regiões genômicas associados com dados clínicos a fim de encontrar possíveis respostas às distintas manifestações da doença.

## 5 CONCLUSÕES

Com os resultados desse trabalho podemos concluir que:

- Dentre os casos suspeitos de ZIKV encaminhados ao Lacen-ES, 178 foram positivos, e a capital Vitória e os municípios de Cariacica e Cachoeiro de Itapemirim são as cidades mais afetadas.
- Houve a confirmação que a linhagem circulante no ES é a Linhagem Asiática – mesma linhagem circulante no restante do país;
- Foram encontradas quatro variações nos dois genes estudados, no gene E: A1023G e C1050T e no gene NS5: C1891T e T1945C.

- As variações A1023T e C1891T foram descritas pela primeira vez em linhagens Asiáticas neste trabalho;
- As variações C1050T e T1945C foram descritas anteriormente em linhagem Asiática apenas uma vez em uma sequência do Rio de Janeiro e três sequências na China, respectivamente.
- Por análises simples de tradução das sequências desse estudo, as variações das sequências do ES não estão associadas à mudança de aminoácidos, porém não se pode descartar que outras mudanças, seja em ligações entre enzimas e o RNA, seja na estrutura das proteínas finais, podem ser causadas por essas variações.

As informações evolutivas aqui apresentadas podem ser úteis a futuros trabalhos, com estes dados aliados a outros trabalhos, os cientistas podem projetar vacinas contra genótipos específicos, insumos para diversos fins, entre outros. Além disso, a expansão da base de dados permite uma visão mais clara da epidemiologia do ZIKV, o que ajudará a determinar a origem geográfica de um novo surto, assim como monitorar a eficácia das medidas de controle.

Finalmente, esse trabalho contribuiu no sentido de iniciar as análises de cepas virais provenientes do ES, uma região endêmica do Brasil ainda pouco estudada. Em um país de proporções continentais e heterogeneidade populacional como Brasil, a filogenética de isolados de vírus da Zika deve representar todas as regiões do País.

## REFERÊNCIAS

- ALCANTARA, D.; O'DRISCOLL, M. Congenital microcephaly. **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 166, n. 2, p. 124-139, 2014. ISSN 1552-4876. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.c.31397> >.
- BAEZ, C. et al. Analysis of worldwide sequence mutations in Zika virus proteins E, NS1, NS3 and NS5 from a structural point of view. **Molecular BioSystems**, v. 13, n. 1, p. 122-131, 2017.
- BALEOTTI, F. G.; MORELI, M. L.; FIGUEIREDO, L. T. M. Brazilian *Flavivirus* phylogeny based on NS5. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 379-382, 2003. ISSN 0074-0276.
- BALM, M. N. et al. A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. **Journal of medical virology**, v. 84, n. 9, p. 1501-1505, 2012. ISSN 1096-9071.
- BALTIMORE, D. Expression of animal virus genomes. **Bacteriological reviews**, v. 35, n. 3, p. 235, 1971.
- BARONTI, C. et al. Complete coding sequence of zika virus from a French polynesia outbreak in 2013. **Genome announcements**, v. 2, n. 3, p. e00500-14, 2014. ISSN 2169-8287.
- BASTOS, M. D. S. **Perfil soropidemiológico do dengue diagnosticado na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (1998-2001)**. 2004.
- BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 13, p. 20751, 2014. ISSN 1560-7917.
- BOGOCH, I. I. et al. Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. **The Lancet**, v. 387, n. 10016, p. 335-336, 2016. ISSN 0140-6736.
- BRINTON, M. A.; DISPOTO, J. H. Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of *Flavivirus* genome RNA. **Virology**, v. 162, n. 2, p. 290-299, 1988. ISSN 0042-6822.
- BUCKLEY, A.; GOULD, E. Detection of virus-specific antigen in the nuclei or nucleoli of cells infected with Zika or Langkat virus. **Journal of general virology**, v. 69, n. 8, p. 1913-1920, 1988. ISSN 1465-2099.

CALISHER, C. H. et al. Antigenic relationships between *Flaviviruses* as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. **Journal of General Virology**, v. 70, n. 1, p. 37-43, 1989. ISSN 1465-2099.

CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 6, p. 653-660, 2016. ISSN 1473-3099.

CALVET, G. A. et al. Study on the persistence of Zika virus (ZIKV) in body fluids of patients with ZIKV infection in Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 49, 2018. ISSN 1471-2334.

CHAMBERS, T. J. et al. *Flavivirus* genome organization, expression, and replication. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 649-688, 1990. ISSN 0066-4227.

CHAN, J. F. et al. Zika fever and congenital Zika syndrome: an unexpected emerging arboviral disease. **Journal of Infection**, v. 72, n. 5, p. 507-524, 2016. ISSN 0163-4453.

CHANG, C. et al. The Zika outbreak of the 21st century. **Journal of autoimmunity**, v. 68, p. 1-13, 2016. ISSN 0896-8411.

CHU, J.; NG, M. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. **Journal of virology**, v. 78, n. 19, p. 10543-10555, 2004. ISSN 0022-538X.

COSTA, F. et al. Emergence of congenital Zika syndrome: viewpoint from the front lines. **Annals of internal medicine**, v. 164, n. 10, p. 689-691, 2016. ISSN 0003-4819.

CUNHA, R. V. D. et al. Zika: abordagem clínica na atenção básica. 2016.

DECKARD, D. T. Male-to-male sexual transmission of Zika virus—Texas, January 2016. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 65, 2016.

DICK, G.; KITCHEN, S.; HADDOW, A. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509-520, 1952. ISSN 0035-9203.

DUDLEY, D. M. et al. A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. **Nature communications**, v. 7, p. 12204, 2016. ISSN 2041-1723.

FALGOUT, B. et al. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. **Journal of virology**, v. 65, n. 5, p. 2467-2475, 1991. ISSN 0022-538X.

FARIA, N. R. et al. Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, p. 345-349, 2016. ISSN 0036-8075.

FAUQUET, C. M. et al. **Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Academic Press, 2005. ISBN 008057548X.

FAYE, O. et al. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. **Virology journal**, v. 10, n. 1, p. 311, 2013. ISSN 1743-422X.

FAYE, O. et al. One-step RT-PCR for detection of Zika virus. **Journal of Clinical Virology**, v. 43, n. 1, p. 96-101, 2008. ISSN 1386-6532.

FAYE, O. et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 1, p. e2636, 2014. ISSN 1935-2735.

FOY, B. D. et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 5, p. 880, 2011.

GIOVANETTI, M. et al. Zika Virus spreading in South America: Evolutionary analysis of emerging neutralizing resistant Phe279Ser strains. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 9, n. 5, p. 445-452, 2016. ISSN 1995-7645.

HADDOW, A. D. et al. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 2, p. e1477, 2012. ISSN 1935-2735.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika virus infection in human skin cells. **Journal of virology**, v. 89, n. 17, p. 8880-8896, 2015. ISSN 0022-538X.

HAYES, E. B. Zika virus outside Africa. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 9, p. 1347, 2009.

HEINZ, F. X.; ALLISON, S. L. *Flavivirus* structure and membrane fusion. **Advances in virus research**, v. 59, p. 63-99, 2003. ISSN 0065-3527.

HUGHES, R. A. et al. Immunotherapy for Guillain-Barré syndrome: a systematic review. **Brain**, v. 130, n. 9, p. 2245-2257, 2007. ISSN 1460-2156.



IOOS, S. et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Medecine et maladies infectieuses**, v. 44, n. 7, p. 302-307, 2014. ISSN 0399-077X.

JACOBS, M. G. et al. Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. **The FASEB Journal**, v. 14, n. 11, p. 1603-1610, 2000. ISSN 0892-6638.

JUN, S.-R. et al. Suggested mechanisms for Zika virus causing microcephaly: what do the genomes tell us? **BMC bioinformatics**, v. 18, n. 14, p. 471, 2017. ISSN 1471-2105.

JUNIOR, V. L. P. et al. Zika virus: a review to clinicians. **Acta medica portuguesa**, v. 28, n. 6, p. 760-765, 2015. ISSN 1646-0758.

KARABATSOS, N. International catalogue of arboviruses, including certain other viruses of vertebrates, American Society of Tropical Medicine and Hygiene. **San Antonio, TX [PubMed]**, 1985.

KHROMYKH, A. A. et al. Coupling between replication and packaging of *Flavivirus* RNA: evidence derived from the use of DNA-based full-length cDNA clones of Kunjin virus. **Journal of virology**, v. 75, n. 10, p. 4633-4640, 2001. ISSN 0022-538X.

KINDHAUSER, M. K. et al. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 9, p. 675, 2016.

KING, A. M. et al. Virus taxonomy. **Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, p. 486-487, 2012.

KUNO, G. et al. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. **Journal of virology**, v. 72, n. 1, p. 73-83, 1998. ISSN 0022-538X.

LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232, 2008.

LANCIOTTI, R. S. et al. Phylogeny of Zika virus in western hemisphere, 2015. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 5, p. 933, 2016.

LESSLER, J. et al. Assessing the global threat from Zika virus. **Science**, v. 353, n. 6300, p. aaf8160, 2016. ISSN 0036-8075.

LI, H. et al. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a

region of 20 amino acids. **Journal of virology**, v. 73, n. 4, p. 3108-3116, 1999. ISSN 0022-538X.

LI, J. et al. The glycosylation site in the envelope protein of West Nile virus (Sarafend) plays an important role in replication and maturation processes. **Journal of general virology**, v. 87, n. 3, p. 613-622, 2006. ISSN 1465-2099.

LI, S. et al. Morphologic and molecular characterization of a strain of Zika virus imported into Guangdong, China. **PloS one**, v. 12, n. 1, p. e0169256, 2017. ISSN 1932-6203.

LINDENBACH, B.; THIEL, H.-J.; RICE, C. Flaviviridae: The 693 Viruses and Their Replication. **Fields**, v. 694, p. 1101-1152, 2007.

LINDENBACH, B. D. et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. **Science**, v. 309, n. 5734, p. 623-626, 2005. ISSN 0036-8075.

LUPI, O.; CARNEIRO, C. G.; COELHO, I. C. B. Manifestações mucocutâneas da dengue. **An Bras Dermatol**, v. 82, n. 4, p. 291-305, 2007.

MA, L. et al. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 10, p. 3414-3419, 2004. ISSN 0027-8424.

MARKOFF, L. 5'-and 3'-noncoding regions in *Flavivirus* RNA. 2003. ISSN 0065-3527.

MEHRJARDI, M. Z. et al. Neuroimaging findings of congenital Zika virus infection: a pictorial essay. **Japanese journal of radiology**, v. 35, n. 3, p. 89-94, 2017. ISSN 1867-1071.

MS - Ministério da Saúde. Descrição da Doença Zika virus. 2015a. Disponível em: < <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/zika-virus/17823-descricao-da-doenca-zika> >. Acesso em: 20/12/2017.

MS - Ministério da saúde. Manifestações Neurológicas. 2015b. Disponível em: < <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/zika-virus/27002-manifestacoes-neurolgicas> >. Acesso em: 20/12/2017.

MS - Ministério da Saúde. Zika virus. 2017. Disponível em: < <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/zika-virus> >. Acesso em: 20/12/2017.

MUSSO, D. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 21, n. 10, p. 1887, 2015.

PLATT, D. J. et al. Zika virus–related neurotropic *Flaviviruses* infect human placental explants and cause fetal demise in mice. **Science translational medicine**, v. 10, n. 426, p. eaao7090, 2018. ISSN 1946-6234.

PLOURDE, A. R.; BLOCH, E. M. A literature review of Zika virus. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 7, p. 1185, 2016.

POIDINGER, M.; HALL, R. A.; MACKENZIE, J. S. Molecular characterization of the Japanese encephalitis serocomplex of the *Flavivirus* genus. **Virology**, v. 218, n. 2, p. 417-421, 1996. ISSN 0042-6822.

RICE, C. M. et al. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for *Flavivirus* gene expression and evolution. **Science**, v. 229, n. 4715, p. 726-733, 1985. ISSN 0036-8075.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and molecular life sciences**, v. 67, n. 16, p. 2773-2786, 2010. ISSN 1420-682X.

ROTH, A. et al. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections—an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 41, p. 20929, 2014. ISSN 1560-7917.

SAIZ, J.-C. et al. Zika virus: the latest newcomer. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 496, 2016. ISSN 1664-302X.

SEJVAR, J. J. et al. Guillain–Barré syndrome and Fisher syndrome: case definitions and guidelines for collection, analysis, and presentation of immunization safety data. **Vaccine**, v. 29, n. 3, p. 599-612, 2011. ISSN 0264-410X.

SMITHBURN, K. Neutralizing antibodies against certain recently isolated viruses in the sera of human beings residing in East Africa. **The Journal of Immunology**, v. 69, n. 2, p. 223-234, 1952. ISSN 0022-1767.

SORIANO-ARANDES, A. et al. What we know and what we don't know about perinatal Zika virus infection: A systematic review. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, n. just-accepted, 2018. ISSN 1478-7210.

STADLER, K. et al. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. **Journal of virology**, v. 71, n. 11, p. 8475-8481, 1997. ISSN 0022-538X.

STRIMMER, K.; VON HAESELER, A. Likelihood-mapping: a simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 13, p. 6815-6819, 1997. ISSN 0027-8424.

TAMURA, K. et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013. ISSN 1537-1719.

VAN DER SCHAAR, H. M. et al. Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. **Journal of virology**, v. 81, n. 21, p. 12019-12028, 2007. ISSN 0022-538X.

Viral Zone. Virion Zika virus. 2016. Disponível em: <<https://viralzone.expasy.org/6756>> Acesso em: 18/02/2018.

VISSEAU, B. et al. Zika virus in the female genital tract. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 11, p. 1220, 2016.

WERNER, H. et al. First-trimester intrauterine Zika virus infection and brain pathology: prenatal and postnatal neuroimaging findings. **Prenatal diagnosis**, v. 36, n. 8, p. 785-789, 2016. ISSN 1097-0223.

WHO, World Health Organization. Microcephaly - Brazil. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/don/27-november-2015-microcephaly/en/>> Acesso em: 20/12/2017.

WHO, World Health Organization. Guillain-Barré Syndrome. 2016a. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/guillain-barre-syndrome/pt/>> Acesso em: 20/12/2017.

WHO, World Health Organization. Doença do vírus Zika. 2016b. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/pt/>>. Acesso em: 20/12/2017.

YE, Q. et al. Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 43, p. 43-49, 2016. ISSN 1567-1348.

YOKOYAMA, S.; STARMER, W. T. Possible roles of new mutations shared by Asian and American Zika viruses. **Molecular biology and evolution**, v. 34, n. 3, p. 525-534, 2017. ISSN 0737-4038.

YOUNG, P. R. et al. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1053-1057, 2000. ISSN 0095-1137.

YUKI, N.; HARTUNG, H.-P. Guillain–Barré syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 24, p. 2294-2304, 2012. ISSN 0028-4793.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569-572, 2015. ISSN 0074-0276.

ZWICKL, D. J. **Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion**. 2006.

**ANEXO 1****CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE/UFES****PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Estudo da diversidade genética e do efeito do Zika virus no desenvolvimento de transtornos neurológicos

**Pesquisador:** Michelle de Oliveira e Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 58753216.4.0000.5060

**Instituição Proponente:** Centro de Ciências da Saúde

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.819.673

**Apresentação do Projeto:**

Este estudo consta de duas etapas:

A proposta da primeira fase do presente projeto de pesquisa inclui a realização de um estudo com abordagem epidemiológica e filogenética a nível populacional com objetivo de analisar a prevalência das distintas arboviroses, e as relações filogenéticas das cepas de ZIKA identificadas com sequências virais disponíveis em bancos de dados. Essa análise permitirá a identificação de novos marcadores moleculares e a inferência dos possíveis processos demográficos envolvidos na introdução do vírus no estado do ES. A partir dos dados obtidos nessa etapa, pretendemos na segunda fase deste projeto, realizar um estudo caso controle sobre o efeito do ZIKV no risco de desenvolvimento de transtornos neurológicos congênitos, assim como a interação desse vírus com fatores epidemiológicos, ambientais e genéticos.

**Objetivo da Pesquisa:**

Segundo o autor:

**Objetivo Primário:**

Analisar a distribuição geográfica e a diversidade genética das arboviroses Zika, Dengue e Chikungunya e estudar o efeito do ZIKV no desenvolvimento de transtornos neurológicos

**Endereço:** Av. Marechal Campos 1468

**Bairro:** S/N

**UF:** ES

**Telefone:** (27)3335-7211

**Município:** VITÓRIA

**CEP:** 29.040-091

**E-mail:** cep.ufes@hotmail.com

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Estudo da diversidade genética e do efeito do Zika virus no desenvolvimento de transtornos neurológicos

**Pesquisador:** Michelle de Oliveira e Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 58753216.4.0000.5060

**Instituição Proponente:** Centro de Ciências da Saúde

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.819.673

**Apresentação do Projeto:**

Este estudo consta de duas etapas:

A proposta da primeira fase do presente projeto de pesquisa inclui a realização de um estudo com abordagem epidemiológica e filogenética a nível populacional com objetivo de analisar a prevalência das distintas arboviroses, e as relações filogenéticas das cepas de ZIKA identificadas com sequências virais disponíveis em bancos de dados. Essa análise permitirá a identificação de novos marcadores moleculares e a inferência dos possíveis processos demográficos envolvidos na introdução do vírus no estado do ES. A partir dos dados obtidos nessa etapa, pretendemos na segunda fase deste projeto, realizar um estudo caso controle sobre o efeito do ZIKV no risco de desenvolvimento de transtornos neurológicos congênitos, assim como a interação desse vírus com fatores epidemiológicos, ambientais e genéticos.

**Objetivo da Pesquisa:**

Segundo o autor:

**Objetivo Primário:**

Analisar a distribuição geográfica e a diversidade genética das arboviroses Zika, Dengue e Chikungunya e estudar o efeito do ZIKV no desenvolvimento de transtornos neurológicos

**Endereço:** Av. Marechal Campos 1468

**Bairro:** S/N

**UF:** ES

**Município:** VITÓRIA

**Telefone:** (27)3335-7211

**CEP:** 29.040-091

**E-mail:** cep.ufes@hotmail.com

Continuação do Parecer: 1.819.673

congenitos no estado do ES.

Objetivo Secundario:

- Estimar a frequencia das diferentes arboviroses (Zika, Dengue e Chikungunya) em amostras biologicas referenciadas ao Lacen;
- Comparar a sensibilidade, especificidade e os valores preditivos positivos e negativos dos testes recomendados para a identificacao das arboviroses pelo Ministerio da Saude com a tecnologia MultiFLEX™ (GenArray™, USA);
- Analisar filogeneticamente as cepas detectadas nas amostras biologicas positivas para ZIKV;
- Estimar os possiveis processos demograficos envolvidos na introducao do ZIKV no estado do ES;
- Realizar o sequenciamento do genoma completo do ZIKV em material biologico positivo viral isolado a partir de maes e/ou bebes disponiveis no Lacen, para os casos de grave acometimento neurologico congenito e casos de exposicao ao virus sem acometimento neurologico;
- Analisar o efeito do ZIKV no risco de desenvolvimento de transtornos neurologicos congenitos, assim como a interacao desse virus com fatores geneticos, moleculares, epidemiologicos, ambientais e clinicos.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Esta pesquisa oferece baixos riscos tanto aos individuos que participarem deste estudo quanto aos pesquisadores envolvidos, pois inclui a utilizacao de material biologico coletado previamente seguindo todas as rigorosas normas de biosseguranca atualmente implementadas pelo LACEN.

Os riscos deste projeto estão relacionados ao contato com materiais biologicos possivelmente contaminados e reagentes quimicos durante o processamento das amostras. A fim de minimizar qualquer dano, todas as etapas da pesquisa seguirao rigorosos protocolos de biosseguranca, assegurando todos os participantes e pesquisadores envolvidos no estudo.. Reiteramos que somente os membros envolvidos no projeto terão acesso aos dados obtidos a partir de exames e questionário realizados para este estudo. Dessa forma, prezamos evitar sua exposição pessoal, assim como de seus dados evitando possíveis constrangimentos.

**Endereço:** Av. Marechal Campos 1468

**Bairro:** S/N

**CEP:** 29.040-091

**UF:** ES

**Município:** VITORIA

**Telefone:** (27)3335-7211

**E-mail:** cep.ufes@hotmail.com



Continuação do Parecer: 1.819.673

**Benefícios:**

A realização deste estudo permitira o levantamento de dados ainda não avaliados para a população do estado do Espírito Santo acerca da frequência das três arboviroses de maior importância atual na saúde pública: Zika, Dengue e Chikungunya. Além disso, os fatores epidemiológicos, moleculares, virais e imunológicas congênitas, a fim de contribuir para o conhecimento regional e internacional por meio da publicação de artigos científicos em revistas indexadas. Na segunda etapa do projeto, na qual o estudo caso-controle será que consentirem participar serão beneficiadas por um acompanhamento gestacional priorizado, com maior disponibilidade de exames tanto quanto forem necessários.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa relevante cientificamente

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Folha de rosto apresentada e adequada

Projeto original apresentado e adequado

Cartas de sigilo e confidencialidade apresentadas e adequadas

Riscos e Benefícios apresentados e em conformidade com a resolução 466/2012

TCLE apresentado e em conformidade com a resolução 466/2012

Regulamento Biorepositório apresentado e ok

Cronograma apresentado e adequado

**Recomendações:**

Toda pesquisa deve seguir a resolução 466/2012 do CNS para conferência utilize o manual de pendências contido no site do CEP - <http://www.ccs.ufes.br/cep>

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

**Endereço:** Av. Marechal Campos 1468

**Bairro:** S/N

**UF:** ES

**Telefone:** (27)3335-7211

**Município:** VITÓRIA

**CEP:** 29.040-091

**E-mail:** cep.ufes@hotmail.com

# CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE/UFES



Continuação do Parecer: 1.819.673

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_772770.pdf	31/10/2016 16:04:46		Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_CORRIGIDA.pdf	31/10/2016 15:58:42	Michelle de Oliveira e Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ANEXOS_TCLE_Quest.pdf	31/10/2016 15:48:15	Michelle de Oliveira e Silva	Aceito
Outros	Resposta_CEPCCS.pdf	26/10/2016 12:30:46	Michelle de Oliveira e Silva	Aceito
Outros	Regulamento_biorrepositorioR441.pdf	25/10/2016 20:48:17	Michelle de Oliveira e Silva	Aceito
Outros	Anuencia_CamillaMazzoni.pdf	25/10/2016 20:47:15	Michelle de Oliveira e Silva	Aceito
Outros	Anuencia_LACEN.pdf	25/10/2016 20:46:56	Michelle de Oliveira e Silva	Aceito
Cronograma	Cronograma_Corrigido.pdf	25/10/2016 20:45:35	Michelle de Oliveira e Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoInfraCEP_ZIKV.pdf	10/08/2016 01:26:22	Michelle de Oliveira e Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoConfidencialidadeRaquelReis.pdf	10/08/2016 01:20:04	Michelle de Oliveira e Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoConfidencialidadeRaquel.pdf	10/08/2016 01:19:03	Michelle de Oliveira e Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoConfidencialidadeLidiane.pdf	10/08/2016 01:18:26	Michelle de Oliveira e Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoConfidencialidadeElaine.pdf	10/08/2016 01:18:00	Michelle de Oliveira e Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoConfidencialidadeluri.pdf	10/08/2016 01:17:31	Michelle de Oliveira e Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoConfidencialidadeMichelle.pdf	10/08/2016 01:14:08	Michelle de Oliveira e Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCEP_ZIKV_0908.pdf	10/08/2016 01:11:05	Michelle de Oliveira e Silva	Aceito

## Situação do Parecer:

Aprovado

## Necessita Apreciação da CONEP:

Não

**Endereço:** Av. Marechal Campos 1468

**Bairro:** S/N

**UF:** ES

**Município:** VITORIA

**Telefone:** (27)3335-7211

**CEP:** 29.040-091

**E-mail:** cep.ufes@hotmail.com

CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE/UFES



Continuação do Parecer: 1.819.673

VITORIA, 14 de Novembro de 2016

---

**Assinado por:**  
**Maria Helena Monteiro de Barros Miotto**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Marechal Campos 1468

**Bairro:** S/N

**UF:** ES

**Município:** VITORIA

**Telefone:** (27)3335-7211

**CEP:** 29.040-091

**E-mail:** cep.ufes@hotmail.com